

MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA

**Efeito da mutação das cisteínas nas posições 414, 426, 446 e 451 da
proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências -
Bioquímica da Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Curitiba

2007

MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA

**Efeito da mutação das cisteínas nas posições 414, 426, 446 e 451 da
proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rose Adele Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Curitiba

2007

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora, Rose Adele, por toda a ajuda, seja nas discussões, ou nos experimentos, ou mesmo incentivando e estimulando a realização de um trabalho com excelência.

Ao professor Emanuel, que ajudou muito nas discussões, e sempre conseguiu arrumar um tempo para pensar e fazer sugestões para o trabalho, além de ser um exemplo de dedicação a pesquisa.

A todos os professores do núcleo de fixação de nitrogênio, Fábio Pedrosa, Leda, Maria Berenice, Liu, Roseli Wassem e Leonardo, que sempre deram todo o apoio necessário para a realização do trabalho.

A todos os amigos e colegas do laboratório de fixação, que ajudaram muito na execução do trabalho e nos papos furados que foram importantes nos momentos de maior stress.

Aos técnicos do Núcleo de Fixação de nitrogênio Válter, Roseli Prado e Dona Jú, por toda a ajuda e apoio que foram dados.

Um agradecimento especial ao pessoal da 279, André, Juliana, Halisson, Larissa C., Letícia, Rafael, Marco Antônio e Giovana, pelo contato próximo e troca de informações preciosas sobre o trabalho.

Ao Luciano e Ana Claudia pela ajuda nos experimentos de Western blot.

Ao pessoal da turma do mestrado pelo companheirismo e ajuda em todas as disciplinas que fizemos juntos.

Aos meus pais, por todo apoio e por sempre terem sido um exemplo de trabalho e dedicação para alcançar os objetivos.

Ao curso de Pós-graduação em bioquímica e as agências financiadoras, pela bolsa e pelo suporte para o desenvolvimento do projeto.

A Rosana, minha esposa, com quem tive o prazer de casar durante o mestrado, por sempre me acompanhar e apoiar, suportando ausências, finais de semana e feriados inteiros no laboratório, e mau humor porque o experimento não deu certo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix

1. Introdução	1
1.1 Fixação biológica de nitrogênio	1
1.1.1 Complexo da nitrogenase	2
1.2 Assimilação de nitrogênio	3
1.2.1 Captação de amônia.....	4
1.3 Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema ntr	5
1.4 O regulon σ^{54}	7
1.4.1 Ativadores de transcrição dependentes de σ^{54}	9
1.5 Proteína NifA.....	15
1.5.1 Estrutura e função dos domínios da proteína NifA.....	15
1.5.2 Controle da atividade da proteína NifA	18
1.5.2.1 Controle da atividade da proteína NifA nas γ -proteobactérias	18
1.5.2.2 Controle da atividade da proteína NifA nas α e β -proteobactérias	22
2. Objetivos	25
3. Materiais e métodos	26
3.1 Bactérias e plasmídeos.....	26
3.2 Meios de Cultura	29
3.3 Antibióticos.....	30
3.4 Manipulação do DNA	31
3.4.1 Transformação bacteriana	31
3.4.2 Purificação de DNA plasmidial.....	32
3.4.3 Eletroforese de DNA	32
3.4.4 Purificação de DNA por eletroforese de baixo ponto de fusão	33
3.4.5 Sequenciamento de DNA	33
3.4.6 Mutagênese sítio-dirigida.....	34

3.5	Ativação da transcrição <i>in vivo</i>	36
3.5.1	Atividade de β -galactosidase.....	37
3.6	Quantificação de proteínas	37
3.7	Ensaio da Nitrogenase.....	38
3.8	Eletroforese de proteínas.....	38
3.9	Teste de expressão.....	39
3.10	“Western blot”	39
3.10.1	Preparação das amostras para analisar a expressão das proteínas NifA mutantes nos extratos celulares.....	40
3.10.2	Transferência das proteínas para a membrana	40
3.10.3	Tratamento da membrana	41
4.	Resultados e discussão	43
4.1	Mutagênese sítio dirigida do gene <i>nifA</i>	43
4.2	Construção de plasmídeos recombinantes contendo seqüências codificadoras para as proteínas NifA mutantes	44
4.3	Teste de expressão das proteínas mutantes	51
4.4	Atividade transcricional da proteínas de fusão mutantes.....	53
4.5	Complementação da estirpe mutante SmR54 de <i>H. seropedicae</i>	61
4.6	Análise estrutural <i>in silico</i> da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i>	62
4.6.1	Identificação de determinantes estruturais na proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> por alinhamento	63
4.6.2	Predição da estrutura terciária da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> 65	
5.	Conclusões	68
6.	Referências bibliográficas	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo estrutural do domínio AAA+ de PspF	11
Figura 2 – Modelo estrutural de um hexâmero ativo de NtrC	12
Figura 3 – Modelo da ativação da transcrição σ^{54} dependente em PspF	14
Figura 4 – Modelo esquemático dos domínios modulares da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i>	16
Figura 5 – Posição relativa dos oligonucleotídeos iniciadores no gene <i>nifA</i>	35
Figura 6 – Megaprimeres amplificados	43
Figura 7 – Gene <i>nifA</i> mutante amplificado	44
Figura 8 – Vetor pCR2.1	45
Figura 9 – Perfil eletroforético de clones em pCR2.1 digeridos com a enzima EcoRI	46
Figura 10 – Eletroforograma da região mutagenizada do gene <i>nifA</i>	48
Figura 11 – Esquema de clonagem dos genes mutantes	50
Figura 12 – Teste de expressão das proteínas NifA Cys1, NifA Cys3 e NifA Cys4	52
Figura 13 - Teste de expressão da proteína NifA Cys2.....	53
Figura 14 – Ativação da transcrição <i>in vivo</i> pelas proteínas mutantes.....	55
Figura 15 – Ensaio de “Western blot” das culturas expressando a proteína NifA	56
Figura 16 – Estrutura dos aminoácidos cisteína e serina.....	57
Figura 17 – Alinhamento da seqüência de aminoácidos dos domínios central+C-terminal da proteína NifA de organismos de diferentes classes das Proteobactérias	59
Figura 18 – Atividade da nitrogenase da estirpe SmR54 complementada.....	62
Figura 19 – Alinhamento dos domínios AAA da proteína NifA de <i>H. seropedice</i> e PspF de <i>E. coli</i>	64
Figura 20 – Predição da estrutura tridimensional do domínio central da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AAA+ - ATPases associadas com várias atividades celulares

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

Amp –resistência a ampicilina

ATase – Enzima adenililtransferase

ATP – Adenosina trifosfato

Cm –resistência a Cloranfenicol

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – 5'-trifosfato de 2'desoxinucleotídeos

DO – Densidade ótica

EDTA – Ácido etilenodiamino-tetra-acético

EBP – proteína que se liga a um enhancer

FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo

GDH – Glutamato desidrogenase

GOGAT – Glutamato Sintase

GS - Glutamina Sintase

IPTG - β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo

K Ω - Quilo Ohms

Kb - Quilobase

KDa – Quilo Daltons

Km –resistência a canamicina

KV – Quilo Volts

ONPG – o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

pb – pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

RBS – sítio de ligação para ribossomo

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SRH – Segunda região de Homologia

TRIS – Tris(hidroximetil)-aminometano

UAS – Sequência regulatória a montante

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo

RESUMO

A proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* é a ativadora de transcrição dos genes *nif*, cujos produtos compõem e montam o complexo enzimático da nitrogenase. Dessa forma, a proteína NifA tem papel central na regulação de fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*. A atividade da proteína NifA é regulada pelos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado. O mecanismo de modulação da atividade da proteína por esses sinais ambientais ainda não está claro. A sensibilidade da proteína NifA de *H. seropedicae* ao oxigênio provavelmente está relacionada com um motivo de 4 cisteínas, localizado no final do motivo central e na região interdomínios dessa proteína. Possivelmente esse motivo forma um cluster metálico, que pode regular a atividade da proteína em resposta ao nível redox do ambiente. Nesse trabalho o motivo conservado de cisteínas foi mutagenizado e a atividade das proteínas mutantes foi testada *in vivo*. Os resultados sugerem que de fato esse motivo é essencial para a atividade da proteína, indicando que parece exercer um papel importante no processo de ativação da transcrição.

ABSTRACT

The NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* is responsible to activate the transcription of *nif* genes, whose products mount the enzymatic complex of nitrogenase. Thus, the NifA protein has a central role on the regulation of nitrogen fixation. The levels of oxygen and fixed nitrogen regulate the activity of NifA protein. The way how the NifA protein activity is modulated by these environmental signals is not clear. The sensibility of *H. seropedicae* NifA protein to oxygen probably is related to a four cysteines motif, located in the final of Central domain and interdomains region. Possibly this motif forms a metallic cluster that can regulate the protein activity in response to redox level of environment. In these work, the conserved cysteine motif were mutagenised and the activity of mutant proteins were assayed *in vivo*. The results suggest that these motif is essential to protein activity, indicating that these cystein motif seems to be important in transcription activation.

1. Introdução

Herbaspirillum seropedicae foi isolado em 1984 por Baldani e colaboradores, da rizosfera, interior e superfície de raízes de plantas de milho, sorgo e arroz (Baldani et al, 1984). Posteriormente, *H. seropedicae* também foi encontrado colonizando bananeira e abacaxizeiro (Cruz et al, 2001). Inicialmente, foi incluído no gênero *Azospirillum* devido à morfologia e fisiologia semelhantes às bactérias deste gênero (Baldani et al, 1984). No entanto, estudos posteriores de homologia de DNA mostraram evidências que motivaram a proposta da criação de um novo gênero, o *Herbaspirillum*, pertencente o sub-grupo β das proteobactérias (Baldani et al, 1986; Baldani et al, 1996). *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, vibrióide, com grande motilidade quando em concentrações de oxigênio próximas das encontradas no ambiente natural. *Herbaspirillum seropedicae* é capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar qualquer dano aparente para o hospedeiro, sendo por isso considerado endofítico (Olivares et al, 1997).

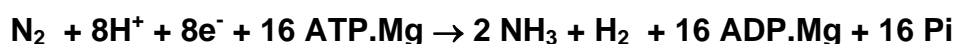
Herbaspirillum seropedicae é um organismo diazotrofo, ou seja, é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia. É provável que o nitrogênio fixado por *Herbaspirillum seropedicae* seja utilizado pela planta a qual ele se associa (Roncato-Maccari et al, 2003; Gyaneshwar et al, 2002; Ramos et al, 2001). Além disso, *H. seropedicae* pode contribuir para o crescimento da planta pela produção de fitohormônios (Schwab, 2006). Esses fatores fazem com que *H. seropedicae* tenha grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante, podendo ser usado como uma alternativa mais eficiente e menos poluente que os fertilizantes nitrogenados.

1.1 Fixação biológica de nitrogênio

Todos os organismos vivos necessitam de nitrogênio, que é um constituinte de várias biomoléculas. No entanto, a maior parte do nitrogênio atmosférico, que representa cerca de 75% da atmosfera, está ligado na forma de N_2 . A maioria dos organismos vivos não tem a capacidade de quebrar a tripla ligação existente entre os dois átomos de nitrogênio na molécula N_2 . Para que o nitrogênio fique

disponível para esses organismos, é necessário que este elemento esteja em uma forma mais reativa, ligado a um carbono, hidrogênio ou oxigênio, mais freqüentemente como uma molécula orgânica (geralmente um aminoácido), amônia (NH₃) ou nitrato (NO₃) (Fields, 2004).

Os organismos diazotrofos, como o *H. seropedicae*, são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia, tornando-o disponível para outros organismos, como a planta hospedeira. A redução do nitrogênio atmosférico à amônia é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase. A estequiometria dessa redução é mostrada abaixo (Simpson e Burris, 1984):



1.1.1 Complexo da nitrogenase

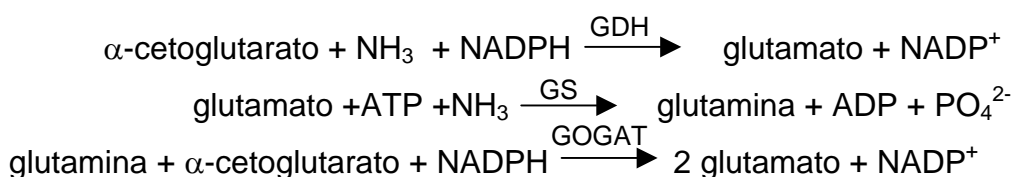
Os produtos dos genes *nif* são responsáveis pela estrutura, montagem e biossíntese do complexo enzimático da nitrogenase (Merrick, 1992). Esse complexo consiste em duas proteínas que podem ser purificadas separadamente: a dinitrogenase e a dinitrogenase redutase (Bulen e Le-comte, 1966; Hageman e Burris, 1978). A dinitrogenase, também conhecida como proteína MoFe ou componente I, é um tetrâmero com 220- a 240-KDa, do tipo $\alpha_2\beta_2$, formado pelos produtos dos genes *nifD* e *nifK* respectivamente. Esse tetrâmero contém 2 pares de metaloclusters, conhecidos como cluster-P e cofator ferro molibdênio (FeMo-co) (Mayer et al, 1999; Shah e Brill, 1977). Cada par de subunidades NifK e NifD contém um cluster-P e uma molécula de FeMo-co. FeMo-co é composto por homocitrato e um cluster MoFe₃-S₃ ligado a um cluster Fe₄-S₃ por três enxofres ligantes. O átomo de molibdênio é coordenado com o C-2 carboxílico e a hidroxila do homocitrato. O cluster-P é um cluster [8Fe-7S] com uma estrutura similar à do FeMo-co, que consiste em dois clusters [4Fe-3S] conectados por um átomo de enxofre central. O cluster-P está localizado na interface das subunidades NifK e NifD e é coordenado por resíduos cisteinil das duas subunidades (Corbett et al, 2004).

A dinitrogenase redutase, também conhecida como proteína Fe ou componente II, é um homodímero com cerca de 60KDa, formado pelo produto do gene *nifH*. Esse dímero contém um único cluster [4Fe-4S] na interface das subunidades e dois sítios de ligação para Mg-ATP, um em cada subunidade (Ryle et al, 1996; Schlessman et al, 1998; Jang et al, 2000).

A proteína Fe é a doadora de elétrons para a proteína MoFe; os elétrons são transferidos do cluster [4Fe-4S] da proteína Fe para o cluster-P da proteína MoFe, e então para o FeMo-co, que é o sítio da redução do nitrogênio (Christiansen e Dean, 2001; Burgess e Lowe, 1996). Além disso, a proteína Fe também parece estar envolvida na biossíntese e maturação da FeMo-co e maturação da proteína apo-MoFe (Dos Santos et al, 2004).

1.2 Assimilação de nitrogênio

Os aminoácidos glutamato e glutamina são moléculas chave na utilização de nitrogênio pela célula, funcionando como doadores de nitrogênio para muitas reações biossintéticas (Merrick e Edwards, 1995). Existem duas grandes vias de assimilação de amônia em *Escherichia coli*: a via da enzima glutamato desidrogenase (GDH) e a via da enzima glutamina sintetase (GS), que é codificada pelo gene *glnA*. Quando a amônia é assimilada via GS, a glutamina sintetizada é transformada em glutamato, em uma reação catalisada pela glutamato sintase (GOGAT) (Reitzer, 2003):



Em *E. coli*, a via GS-GOGAT, que consome ATP, é utilizada em ambientes ricos em energia, enquanto que a via GDH é empregada em ambientes com quantidades limitantes de energia (Helling, 1998; Helling, 1994). A via GS-GOGAT é mais apropriada para assimilação em um meio com

concentrações limitantes de nitrogênio, tendo em vista que GS tem um K_m muito menor para amônia do que GDH (Reitzer, 2003).

1.2.1 Captação de amônia

A amônia é uma base fraca e, em pH fisiológico, a maior parte das moléculas permanece na forma do íon NH_4^+ . Em altas concentrações de amônia no ambiente (tipicamente acima de 1mmol/L), ocorre difusão simples da forma não carregada suficiente para promover o crescimento celular (Zheng et al, 2004). No entanto, é importante que haja um mecanismo de captação ativa de amônia, para manter o nitrogênio fixado dentro da célula.

Uma proteína transportadora de amônia de alta afinidade, da família Amt/Mep, foi identificada inicialmente em *Saccharomyces cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana* (Marini et al, 1994; Ninnemann et al, 1994). Após isso, esses transportadores foram identificados em todos os três domínios dos seres vivos (Thomas et al, 2000b). Em muitas bactérias já se sabe que os transportadores dessa família são importantes na captação de amônio ou metilamônio, entre elas *Corynebacterium glutamicum* (Siewe et al, 1996), *Azospirillum brasilense* (Van Dommelen et al, 1998), *Azorhizobium caulinodans* (Michel-Reydellet e Kaminski, 1999), *Azotobacter vinelandii* (Meletzus et al, 1998), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Montesinos et al, 1998), *Escherichia coli* (Soupene et al, 1998), *Klebsiella pneumoniae* (Jack et al, 1999) e *Herbaspirillum seropedicae* (Noindorf et al, 2005).

Em muitos casos, a presença de altas concentrações de amônia no ambiente extracelular inibe a atividade do transportador e, em *Escherichia coli*, a atividade do transportador está sob controle do sistema Ntr (Jayakumar et al, 1989; Merrick e Edwards, 1995).

Quase todas as bactérias e arqueobactérias codificam pelo menos uma proteína Amt e, com raras exceções, o gene estrutural *amtB* está geneticamente ligado ao gene *glnK*, formando um operon (Thomas et al, 2000a). Thomas e colaboradores (2000b), baseados nessa ligação genética, propuseram que GlnK e AmtB poderiam interagir fisicamente para regular a atividade de AmtB *in vivo*.

Posteriormente, Coutts e colaboradores (2002) mostraram que a proteína GlnK de *Escherichia coli* e *Azotobacter vinelandii* é seqüestrada na membrana, de forma dependente de AmtB e que, na ausência de GlnK, a atividade de AmtB aumenta, indicando que GlnK provavelmente age como um regulador negativo do transportador. Essa ligação na membrana é dependente do estado de uridililação de GlnK e dependente da disponibilidade de nitrogênio na célula, sendo que é máxima quando a quantidade de nitrogênio fixado é alta (Coutts et al, 2002). Javelle e colaboradores (2004) mostraram que se forma um complexo GlnK desuridililada - AmtB cerca de 30 segundos após a adição de amônia em uma cultura crescendo em condições limitantes de nitrogênio, e que este complexo diminui a captação de amônia pelo transportador (Javelle et al, 2004). Resultados semelhantes também foram mostrados em *Azospirillum brasilense* e *Rhodospirillum rubrum*, onde GlnK (*R. rubrum*) ou GlnZ (*A. brasilense*) desuridililadas formam um complexo com a membrana, de maneira dependente de AmtB, indicando que de fato proteínas do tipo PII parecem interagir com AmtB (Wang et al, 2005; Huergo et al, 2006). Recentemente a estrutura tridimensional do complexo GlnK-AmtB de *E. coli* foi descrita (Conroy et al, 2007; Gruswitz et al, 2007).

1.3 Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema ntr

O sistema *ntr* ("nitrogen regulation system") de *E. coli* é composto por seis proteínas: NtrB, NtrC, GlnD, PII, Atase (GlnE) e glutamina sintetase (GS ou GlnA) (Merrick e Edwards, 1995).

As proteínas PII formam homotrímeros, que têm sua atividade regulada por uridililação/desuridililação, que por sua vez é catalisada pela enzima GlnD (Adler et al, 1975). Em condições limitantes de nitrogênio, a GlnD tem sua atividade uridilil-transferase estimulada, e adiciona um grupamento UMP a PII. A proteína GlnB uridililada não liga NtrB que, na forma livre, catalisa a fosforilação de NtrC, ativando-a. NtrC fosforilada irá ativar a transcrição de genes envolvidos na assimilação de fontes alternativas de nitrogênio. Nesse processo, NtrB é inicialmente autofosforilada no resíduo His-139, numa reação que envolve hidrólise de ATP (Ninfa e Magasanik, 1986).

Em ambiente rico em nitrogênio a concentração de glutamina na célula é aumentada; com isso a atividade removedora de uridilil de GlnD é estimulada, favorecendo a desuridililação de PII. PII, no estado não uridililada, interage com NtrB, que catalisa então a desfosforilação de NtrC. NtrC desfosforilada não é capaz de ativar a transcrição (Reitzer, 2003).

A molécula efetora da regulação transcricional exercida pelo sistema Ntr, a NtrC, é uma proteína dimérica, na qual cada subunidade possui massa em torno de 55 KDa (Merrick e Edwards, 1995). NtrC faz parte do grupo de proteínas ativadoras de transcrição dependentes de σ^{54} (Kustu et al, 1989; Morett e Segovia, 1993). Como é característico nesse grupo de proteínas ativadoras de transcrição, NtrC possui três domínios distintos: o N-terminal, com uma atividade regulatória, o central, que é o domínio catalítico, interage diretamente com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase e possui um sítio de ligação de ATP, e o C-terminal, que possui um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA (Drummond et al, 1986).

Apenas NtrC fosforilada é capaz de ativar a transcrição a partir de promotores alvo. A fosforilação parece não estar relacionada com a ligação de NtrC ao DNA, mas sim a oligomerização dos dímeros de NtrC no sítio de ligação desta proteína no DNA (Reitzer, 2003). Os genes que tem sua transcrição ativada por NtrC incluem *glnA*, *ntrBC*, *glnHPQ* (envolvidos no transporte da glutamina), *argT* (envolvido no transporte de arginina), *hisJQMP* (envolvidos no transporte de histidina), *nasFEDCBA* (envolvidos na assimilação de nitrato) e o gene *nifA*, cujo produto regula a transcrição dos genes *nif* (Merrick e Edwards, 1995).

A enzima GS, que catalisa a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia, é regulada por adenilação/desadenilação. A reação de adenilação/desadenilação da GS é catalisada pela enzima ATase (Arcondéguy, 2001). A enzima ATase, por sua vez, tem sua atividade regulada pelas proteínas do tipo PII. Em altos níveis de nitrogênio fixado, a ATase complexa com GlnB livre e glutamina e catalisa a adenilação de GS, inativando-a. Em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a GS é ativada por desadenilação também catalisada pela ATase complexada a GlnB-UMP.

O sistema Ntr também é regulado por α -cetoglutarato. Essa molécula regula a atividade de PII ligando-se diretamente a ela (Kamberov et al, 1995). Cada trímero de PII possui três sítios para ligação de α -cetoglutarato. A ligação de α -cetoglutarato na proteína PII é cooperativa (Arcondéguy et al, 2001). Em concentrações fisiológicas de α -cetoglutarato, pelo menos uma molécula de α -cetoglutarato é ligada por trímero (Kamberov et al, 1995). Essa ligação exerce cooperatividade negativa na ligação de moléculas de α -cetoglutarato adicionais na proteína PII, sendo que a forma completamente saturada de PII com α -cetoglutarato só acontece em concentrações bastante altas de α -cetoglutarato, quase acima da faixa fisiológica (Kamberov et al, 1995). A ligação de α -cetoglutarato regula a habilidade de PII de interagir com ATase. A forma completamente saturada de α -cetoglutarato não é capaz de interagir NtrB (Kamberov et al, 1995). Dessa forma, o sinal de carbono pode ir contra o sinal de nitrogênio, resultando na integração de dois tipos de informação. (Ninfa e Atkinson, 2000).

1.4 O regulon σ^{54}

Para que ocorra a transcrição de qualquer gene, o núcleo da RNA polimerase, composto pelas subunidades $\alpha_2\beta\beta'\omega$, precisa se combinar com a subunidade sigma. Assim, forma-se a holoenzima RNA polimerase, $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$, que é capaz de transcrever o gene. Existem diferentes fatores sigma, que são capazes de distinguir entre diferentes promotores, requeridos para diferentes funções celulares (Buck et al, 2000). O fator sigma determina a especificidade da RNA polimerase (Paget e Helmann, 2003). Ele participa do reconhecimento e ligação do promotor alvo, além de participar da desnaturação do DNA, para que ocorra a transcrição (Fenton et al, 2000; Guo e Gralla, 1998; Wosten, 1998).

Baseando-se em critérios estruturais e funcionais, é possível dividir os diferentes tipos de fatores sigma em dois grupos: σ^{54} e σ^{70} (Buck et al, 2000). σ^{70} é a maior classe, responsável pela transcrição da maioria dos genes durante o crescimento exponencial de uma bactéria (Lonetto et al, 1992). σ^{54} corresponde a uma classe de fatores sigma não homólogos a sigma-70, responsável pela

transcrição de genes cujos produtos desempenham diversas funções biológicas, geralmente não essenciais para a sobrevivência da bactéria (Merrick e Chambers, 1992).

A subunidade σ^{54} , codificada pelo gene *rpoN*, foi inicialmente encontrada em enterobactérias (Hirschman et al, 1985; Hunt e Magasanik, 1985), mas posteriormente foi descrita em muitas outras bactérias, incluindo tanto bactérias gram-negativas quanto gram-positivas (Buck et al, 2000). O mecanismo de iniciação da transcrição dependente de sigma 54 parece ser comum para os diferentes genes estudados até o momento (Kustu et al, 1989). A subunidade σ^{54} da RNA polimerase necessita da presença de uma proteína ativadora de transcrição para que ela exerça sua função (Reitzer e Schneider, 2001). Essa necessidade permite que a transcrição a partir de promotores dependentes de σ^{54} possa ser estreitamente regulada, com baixos níveis de escape de transcrição (Wang e Gralla, 1998).

Os ativadores de transcrição dependentes de σ^{54} , também chamados de EBPs (“enhancer binding protein”), ligam-se no DNA em regiões relativamente distantes do início de transcrição, conhecidas como “enhancers” ou UAS (“upstream activator sequence”). Eles interagem com o complexo de transcrição através de uma volta no DNA, que aproxima o UAS do promotor (Scott et al, 2000; Buck et al, 2000; Zhang et al, 2002). Os ativadores de transcrição possuem seqüências consenso de ligação de ATP, que é hidrolisado para que a transcrição possa ser iniciada. Análise e comparação de seqüências das EBPs permitiram identificá-las como pertencentes à superfamília das proteínas AAA+ (“ATPases associated with various cellular activities”) (Schumacher et al, 2004).

As EBPs ligam-se nas UAS através de um motivo conservado hélice-volta-hélice de ligação ao DNA contido no domínio C-terminal (Cannon et al, 1990; Bondareko et al 2002).

A RNA polimerase σ^{54} reconhece regiões conservadas no promotor do gene, localizadas nas seqüências consenso -12 e -24 (Zhang et al, 2002). Antes da ativação da transcrição, a holoenzima RNA polimerase forma um complexo fechado com o promotor do gene a ser transcrito (Sasse-Dwight e Gralla, 1988). Esse complexo fechado é bastante estável e, por isso, não isomeriza

espontaneamente para o complexo aberto. Nesse momento uma volta no DNA aproxima a EBP do complexo fechado (Su et al, 1990). Essa volta é favorecida por proteínas indutoras de curva (Carmona e Magasanik, 1996; Carmona et al, 1997). A proteína IHF (“integration host factor”) é responsável por dobrar o DNA para aproximar EBPs do sítio de ligação da RNA polimerase de vários promotores σ^{54} -dependentes (Carmona e Magasanik, 1996; Carmona et al, 1997; Wassem et al, 2000; Wassem et al, 2002). Após o dobramento do DNA pode ocorrer a isomerização do complexo fechado para um complexo aberto, em um passo que requer a hidrólise de ATP (Buck et al, 2000). Dessa forma, os processos de formação do complexo fechado e isomerização para complexo aberto, podem ser regulados de forma independente (Wang e Gralla, 1998).

As EBPs apresentam atividade ATPasica em resposta a um determinado sinal ambiental e, dessa forma, geram energia para formar o complexo aberto e, através disso, ativar a transcrição. Quando o estímulo fisiológico é retirado, a atividade ATPasica é desligada, e os promotores voltam ao estado de complexo fechado inativo (Buck et al, 2000).

1.4.1 Ativadores de transcrição dependentes de σ^{54}

Entre as proteínas ativadoras de transcrição mais bem estudadas até o momento estão as proteínas PspF, DctD, XylR, NtrC, ZraR e a proteína NifA, que foi o objeto de estudo deste trabalho.

Os ativadores de transcrição dependentes de σ^{54} são proteínas modulares, tipicamente consistindo de três domínios (Studholme e Dixon, 2003). O domínio N-terminal tem uma função regulatória e, devido à diversidade funcional dos genes ativados pelos ativadores de transcrição, não é conservado. O domínio C-terminal possui uma sequência de ligação ao DNA bastante conservada. O domínio central, também bastante conservado, é referido como domínio AAA, e é responsável pelas interações com o ATP, hidrólise do ATP e transdução de energia para o complexo fechado (Buck et al, 2006).

As proteínas da superfamília AAA+ são caracterizadas por um domínio (domínio AAA) de ligação a ATP de 200 a 250 aminoácidos (Hanson e Whiteheart, 2005), que nos ativadores de transcrição corresponde ao domínio

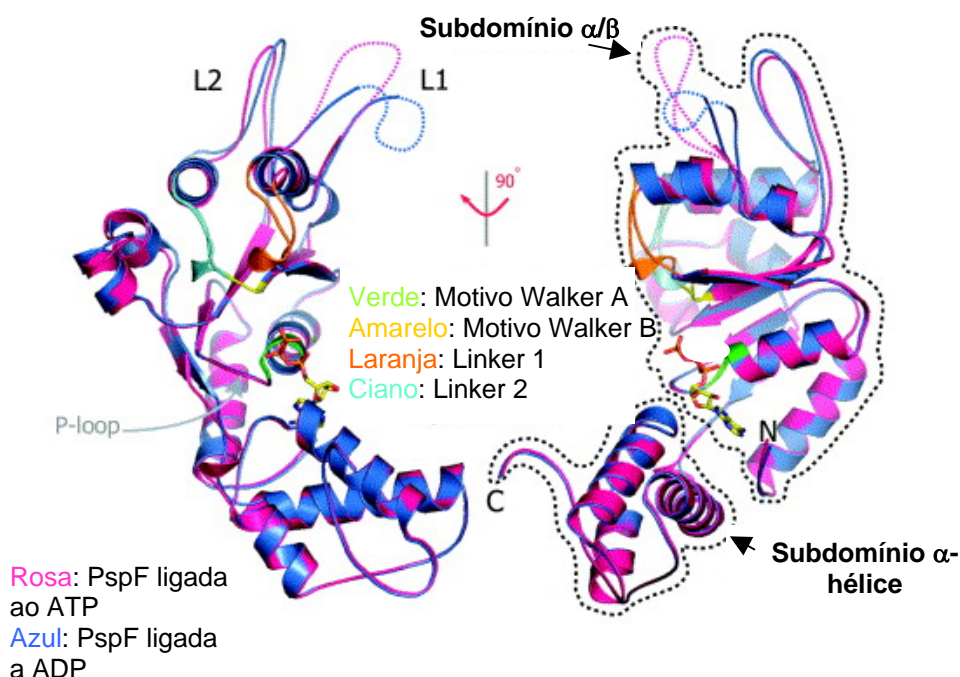
modular central. Esse domínio contém os motivos altamente conservados Walker A (GxxxxGK[T/S], onde x representa qualquer aminoácido) e Walker B (hhhhDE, onde h representa aminoácidos hidrofóbicos) (Rappas et al, 2006b). O motivo Walker A é responsável pela ligação do nucleotídeo, o Walker B pela hidrólise do nucleotídeo (Rappas et al, 2006b).

O motivo Walker A está contido em uma volta na proteína, conhecida como P-loop (Ogura e Wilkinson, 2001). O P-loop interage diretamente com o fosfato do ATP, e o resíduo de lisina do consenso GxxxxGK[T/S] é crucial para a interação com o nucleotídeo (Hanson e Whiteheart, 2005). Mutações nesse motivo geram proteínas que não se ligam ao ATP (Hanson e Whiteheart, 2005). O motivo Walker B também faz contato com o nucleotídeo (Hanson e Whiteheart, 2005). O resíduo de aspartato do consenso hhhhDE é responsável por coordenar Mg^{2+} , necessário para hidrólise de ATP, e o glutamato por ativar a molécula de água para a reação de hidrólise (Ogura e Wilkinson, 2001). Mutações nesse motivo geram proteínas que ligam ATP, mas não são capazes de hidrolisá-lo (Weibezahn et al, 2003; Dalal et al, 2004; Babst et al, 1998).

Várias proteínas da família AAA+ já foram cristalizadas e tiveram suas estruturas estudadas. Baseando-se nesses estudos, puderam ser definidos dois subdomínios do domínio AAA: um N-terminal, conhecido como subdomínio α/β , e um C-terminal, conhecido como subdomínio α -hélice (Hanson e Whiteheart, 2005) (Figura 1).

Os domínios AAA+ geralmente também possuem uma região conservada, posicionada na região C-terminal do motivo Walker B, no subdomínio α/β , conhecida como segunda região de homologia (SRH) (Hanson e Whiteheart, 2005). A SRH contém dois elementos estruturais específicos: o sensor 1 e o “dedo de arginina”, os quais provavelmente estão relacionados com a hidrólise do nucleotídeo e mudanças conformacionais em resposta à hidrólise (Ogura et al, 2004). Os resíduos de aminoácidos do sensor 1 estão localizados entre os motivos Walker A e Walker B, e interagem com elementos do Walker B e com o γ -fosfato do ATP (Hanson e Whiteheart, 2005). Nas estruturas de oligômeros AAA+ conhecidas, o dedo de arginina de uma subunidade constitui parte do sítio de ligação de nucleotídeo de uma subunidade adjacente (Ogura et al, 2004).

Figura 1 – Modelo estrutural do domínio AAA+ de PspF

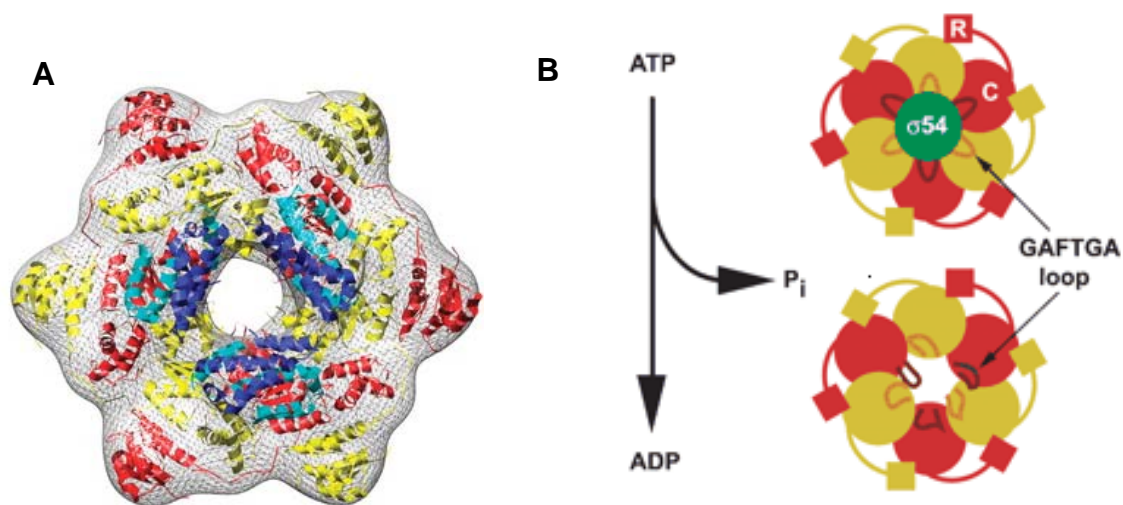


Modelo estrutural da proteína PspF ligada a ADP (modelo azul) e a ATP (modelo rosa). Os dois modelos estão superpostos e alguns dos motivos funcionais estão destacados. (Rappas et al, 2006a).

Próximo à extremidade C-terminal do domínio AAA, no subdomínio α -hélice, encontra-se o sensor 2 (Hanson e Whiteheart, 2005). Os resíduos de aminoácidos do sensor 2 também participam da ligação ao nucleotídeo (Ogura et al, 2004).

As EBPs são tipicamente diméricas no estado inativo. As proteínas da família AAA+, na forma biologicamente ativa, normalmente existem como oligômeros, geralmente hexâmeros (Rappas et al, 2006b) (Figura 2). No hexâmero, os sítios para ligação de ATP ficam posicionados na interface das subunidades (Lupas e Martin, 2002). Esse fato permite que existam ligações diretas e indiretas entre os sítios de ligação de nucleotídeos de subunidades adjacentes. O hexâmero tem um arranjo em forma de anel, com um poro central, que é margeado por aminoácidos de cada um dos monômeros (Hanson e Whiteheart, 2005).

Figura 2 – Modelo estrutural de um hexâmero ativo de NtrC

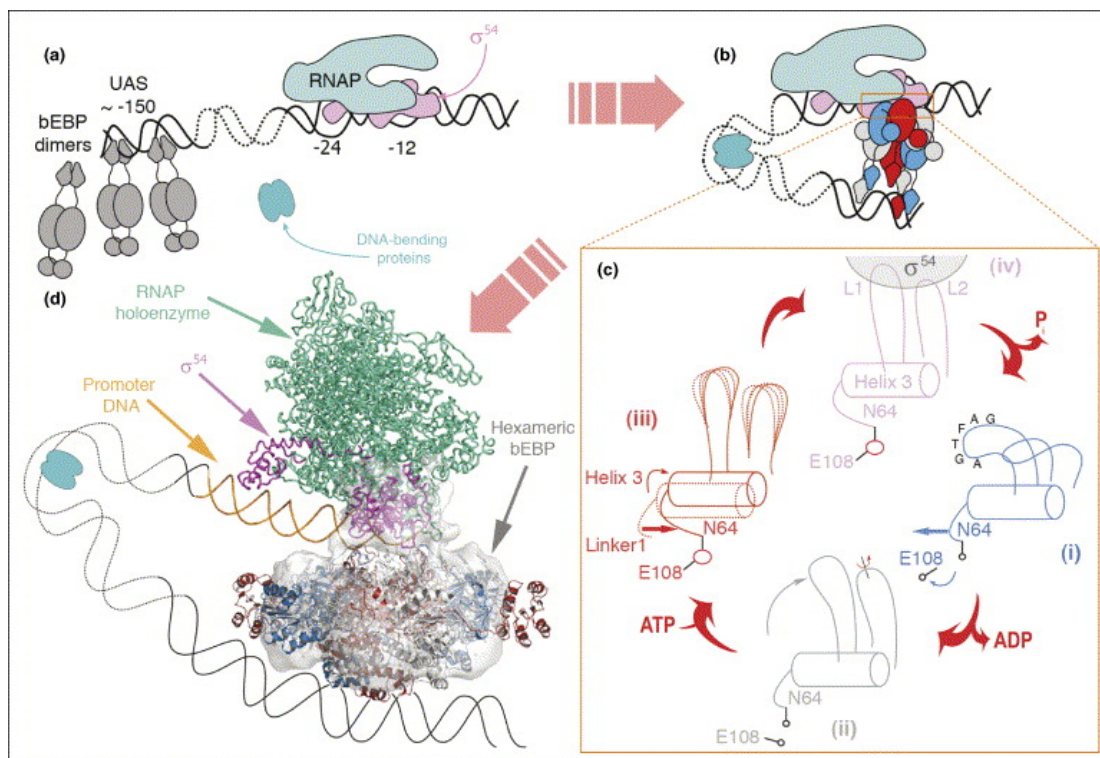


(A) Vista superior do modelo tridimensional da proteína NtrC *Salmonella typhimurium*. Os monômeros de NtrC tem seus domínios central e regulatório representados pelas cores vermelhas ou amarelas, de forma alternada. As cores azul claro e azul escuro representam o domínio de ligação ao DNA. (B) Mecanismo esquemático do remodelamento do hexâmero de NtrC em resposta à hidrólise de ATP. A estrutura R representa o domínio regulatório da proteína, e a C o domínio central. No momento da hidrólise do ATP, o motivo GAFTGA está exposto, e interagindo com a σ^{54} (círculo verde). Quando o fosfato é liberado, o GAFTGA deixa de interagir com σ^{54} e muda a sua conformação. (De Carlo et al, 2006).

Resultados recentes com a proteína NorR, uma EBP, sugerem que três dímeros de NorR ligam-se a três sítios UAS adjacentes, resultando em alta concentração local de NorR, facilitando a oligomerização após ativação do domínio regulatório (Tucker et al, 2004; D'Autreax et al, 2005; Tucker et al, 2005). A formação do oligômero de NorR também provoca a dobra no DNA, essencial para que o ativador faça contato com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase.

Rappas e colaboradores mostraram que a proteína PspF, uma ativadora de transcrição sigma 54 dependente, faz contato com a subunidade σ^{54} através de duas alças, que foram denominadas de L1 e L2 (Rappas et al, 2005). Na superfície da alça L1, foi identificado o motivo GAFTGA, que é altamente conservado nos ativadores de transcrição (Rappas et al, 2005; Buck et al, 2006). Esse motivo está contido na hélice 3 do subdomínio α/β . Resultados bioquímicos anteriores já haviam demonstrado a importância desse motivo para a interação entre o ativador e a subunidade σ^{54} (Chaney et al, 2001; Bordes et al, 2004; Gallegos et al, 1999). Dessa forma, a energia química liberada pela hidrólise do ATP no sítio ativo é convertida e mudanças conformacionais que culminam com uma mudança de posição das alças L1 e L2. Estudos recentes com a proteína PspF complexada com diferentes nucleotídeos demonstraram como ocorre essa conversão (Rappas et al, 2006a) (Figura 3). As mudanças no sítio de ligação de nucleotídeo são sentidas por um par de aminoácidos (E108-N64) e, então, a mudança conformacional é transmitida para as outras porções da proteína, resultando em uma rotação na hélice 3, onde está inserida a alça L1 (Rappas et al, 2006a). Esse fato é suficiente para posicionar corretamente o motivo GAFTGA para interagir com a RNA polimerase- σ^{54} (Rappas et al, 2006a). Essa interação causa mudanças na RNA polimerase- σ^{54} , que leva a formação do complexo aberto e início da transcrição.

Figura 3 – Modelo da ativação da transcrição σ^{54} dependente em PspF



Todo o mecanismo de ativação de PspF, desde a ligação do ativador na UAS, até a hidrólise do ATP, é mostrado. **(A)** Os dímeros inativos da EBP ligam-se ao DNA, enquanto que a RNA polimerase σ^{54} forma um complexo fechado com o DNA promotor. **(B)** Após um estímulo e uma volta no DNA, favorecida por proteínas específicas, a EBP oligomeriza e faz contato com o complexo fechado. **(C)** Transdução da hidrólise do ATP para a proteína. (i) Conformação inativa do motivo GAFTGA, que não interage com a σ^{54} . O par de aminoácidos N64 e E108 não interagem nessa condição. (ii) Motivo GAFTGA "liberado", mas não ligado à σ^{54} . (iii) Estado "aberto" do motivo GAFTGA, quando o ativador está ligado ao ATP; nesse estado a interação entre N64 e E108 é estabelecida. (iv) interação entre o motivo GAFTGA e a σ^{54} . A ligação do nucleotídeo e os estados iniciais de hidrólise (i e ii) são sentidos pelo par de aminoácidos N64 e E108, e transmitindo mudanças conformacionais até que possa ocorrer interações entre as alças L1 e L2. **(D)** Essas mudanças conformacionais culminam com mudanças da estrutura do complexo fechado, que levam à formação do complexo aberto. (Rappas et al, 2006a).

1.5 Proteína NifA

A proteína ativadora de transcrição dos genes *nif*, que atua em conjunto com a RNA polimerase - σ^{54} , é a NifA. Esse mecanismo de ativação foi encontrado em todas as proteobactérias diazotróficas estudadas até o momento (Dixon e Kahn, 2004). Sendo uma proteína da família das EBP, a proteína NifA liga-se a no elemento UAS do DNA (5'-TGT-N₁₀-ACA-3'). Esta sequência está localizada a uma distância de 80 a 150 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição (Morett et al, 1988; Morett e Buck, 1988). Souza e colaboradores (1991a) identificaram e seqüenciaram o gene *nifA* de *Herbaspirillum seropedicae*.

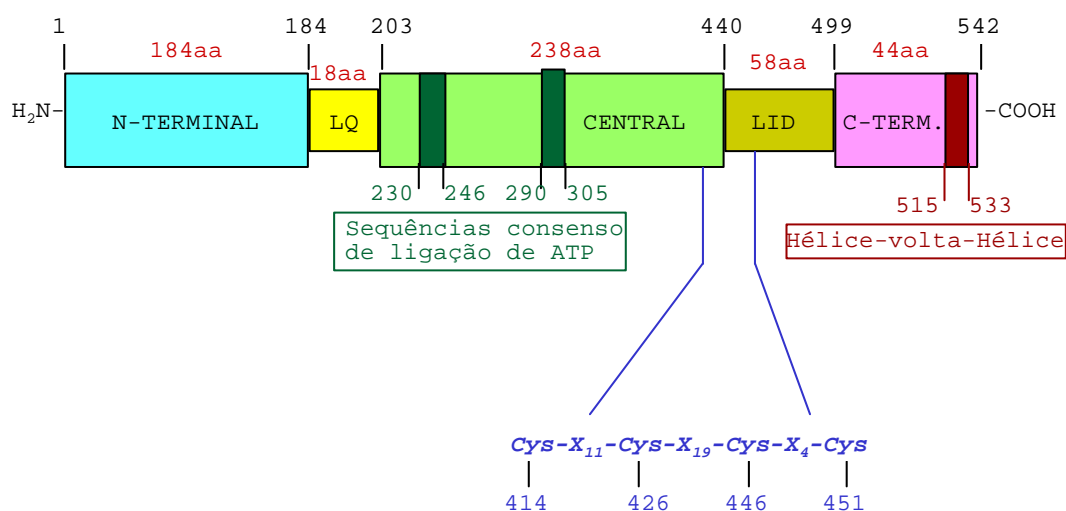
1.5.1 Estrutura e função dos domínios da proteína NifA

A proteína NifA pode ser dividida em três domínios estruturalmente e funcionalmente distintos (Morett e Segovia, 1993). A figura 4 mostra, de forma esquemática, os três domínios modulares da proteína NifA de *H. seropedicae*. O domínio central, típico dos membros da família AAA+, liga ATP e é flanqueado pelo C-terminal que contém um motivo hélice-volta-hélice, e pelo N-terminal, com função regulatória (Dixon e Kahn, 2004). Essa distribuição em domínios modulares é comum entre as EBPs (Drummond et al, 1986).

O domínio N-terminal é o menos conservado de todos, com um baixo grau de identidade (Fischer, 1994). Esse domínio não é essencial para a atividade da proteína, tendo em vista que proteínas NifA com o domínio N-terminal deletado apresentam atividade (Fischer et al, 1988; Monteiro et al, 1999a). O exato papel desse domínio ainda não está claro, mas provavelmente é diferente para diazotrofos diferentes, e parece estar relacionado com regulação da atividade da proteína (Fischer et al, 1988; Fischer, 1994). Em *H. seropedicae* esse domínio parece estar envolvido no controle da atividade da proteína NifA por íons amônia, uma vez que pode ser deletado sem interferir na atividade, eliminando, porém a inibição por amônia (Souza et al, 1999; Monteiro et al, 1999a).

Os domínios N-terminal e central são separados por uma pequena região interdomínios, rica em resíduos de glutamina, e por isso conhecida como Q-linker (Wootton e Drummond, 1989).

Figura 4 – Modelo esquemático dos domínios modulares da proteína NifA de *H. seropedicae*



Os domínios N-terminal, central e C-terminal são mostrados, bem como as regiões interdomínios. Os números em vermelho correspondem à posição do aminoácido na proteína. LQ representa a região interdomínios encontrada entre os domínios N-terminal e central, e o LID a sequência interdomínios entre o central e C-terminal. No central, sequências consenso de ligação de ATP são indicadas em verde. O motivo de 4 cisteínas do central e da sequência interdomínios é evidenciado (Monteiro, 2001).

O domínio central é bastante conservado e possui em torno de 240 aminoácidos (Fischer et al, 1988). Ele não é exclusivo da proteína NifA, mas é comum a pelo menos 13 proteínas ativadoras de transcrição, que pertencem à família AAA+ (Morett e Segovia, 1993). Esse domínio interage com a sigma 54 e hidrolisa ATP para que possa ocorrer a formação do complexo aberto, sendo, portanto, o domínio da proteína NifA que apresenta atividade catalítica (Drummond et al, 1986; Morett e Segovia, 1993; Berger et al, 1995). As proteínas NifA de *Klebsiella pneumoniae* e *Sinorhizobium meliloti* e a DctD de *Rhizobium leguminosarum* apresentam alguma atividade quando o domínio central é separado dos outros domínios, indicando que esse domínio possui de fato a atividade catalítica (Morett et al, 1988; Huala et al, 1992; Huala e Ausubel, 1989).

O domínio C-terminal de todas as proteínas NifA conhecidas até o momento possui um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA bastante conservado (Morett e Segovia, 1993). Experimentos de proteção por metilação *in vivo* mostraram que a NifA de *Klebsiella pneumoniae* de fato se liga em uma região a montante dos genes ativados por essa proteína (Morett e Buck, 1988). Experimentos semelhantes mostraram que proteínas NifA mutantes na região C-terminal tem sua ligação ao DNA afetada (Morett et al, 1988). Monteiro e colaboradores (2003b) mostraram que o domínio C-terminal da NifA de *H. seropedicae* é capaz de ligar-se ao promotor do gene *nifB* *in vitro*. Experimentos *in vivo* também mostraram que o domínio C-terminal da NifA de *H. seropedicae*, quando co-expresso com a proteína NifA N-truncada, diminui a atividade desta, indicando que o domínio C-terminal compete com a NifA N-truncada pela ligação no promotor (Monteiro et al, 2003b).

Em *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii* o domínio C-terminal e o domínio central são ligados diretamente, sem uma região interdomínios, enquanto que em outras bactérias esses domínios são ligados por um segmento contendo 30 a 50 resíduos de aminoácidos (Fischer, 1994). Nas bactérias presentes nos subgrupos α e β das proteobactérias, nos quais essa região está presente, o segmento interdomínios é caracterizado por um motivo de quatro cisteínas (Cys-X11-Cys-X19-Cys-X4-Cys) (Fischer et al, 1988). A deleção desse

motivo na proteína NifA de *Bradyrhizobium japonicum* levou a uma proteína inativa, mostrando que esse motivo parece ser essencial para a atividade da proteína (Fischer et al, 1988). Fischer e colaboradores (1989) também mostraram que o espaçamento entre essas cisteínas parece ser importante para a atividade da proteína NifA. Acredita-se que esse motivo ligue íons metálicos e, com isso, seja capaz de sensoriar o nível redox da célula, constituindo-se em um sensor de oxigênio da proteína, mas o exato papel dele ainda não foi elucidado (Fischer et al, 1988; Souza et al, 1999).

1.5.2 Controle da atividade da proteína NifA

A atividade da proteína NifA das proteobactérias diazotróficas é quase sempre regulada em resposta a dois sinais ambientais: os níveis de oxigênio e nitrogênio fixado. O mecanismo de regulação na subdivisão γ das proteobactérias é bastante diferente do observado nas subdivisões α e β : apenas na subdivisão γ a proteína NifL inibe a NifA diretamente, em resposta a esses sinais ambientais.

1.5.2.1 Controle da atividade da proteína NifA nas γ -proteobactérias

Nas γ -proteobactérias diazotróficas, como *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*, o gene *nifA* é co-transcrito com o gene *nifL*. A proteína NifL funciona como um antiativador, regulando a atividade da proteína NifA em resposta aos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado (Merrick et al, 1982; Dixon e Kahn, 2004). Diferente do que ocorre nos sistemas regulatórios de dois componentes, nos quais uma cascata de fosforilações transmite o sinal ambiental, nesse sistema ocorre uma interação proteína-proteína, formando um complexo NifL-NifA em condições desfavoráveis para a fixação de nitrogênio (Austin et al, 1994). Na presença de nitrogênio fixado ou oxigênio, a NifL é ativa e inibe a atividade ATPásica do domínio AAA+ da proteína NifA (Martinez-Argudo et al, 2004a). Essa inibição parece estar relacionada com o motivo GAF do domínio N-terminal da proteína NifA, indicando que esse domínio controla a

atividade do domínio AAA+ em resposta à proteína NifL (Martinez-Argudo et al, 2004b).

No domínio N-terminal da proteína NifL são encontrados um ou mais motivos sensoriais PAS (Zhulin et al, 1997). O domínio PAS encontra-se distribuído em proteínas de organismos bastante distintos, como bactérias, arqueobactérias, fungos, insetos e vertebrados, e estão envolvidos na recepção de diversos sinais ambientais como oxigênio, luminosidade, potencial redox e outros estímulos (Taylor e Zhulin, 1999). A especificidade da recepção está normalmente relacionada com cofatores que se associam com o motivo. No caso da proteína NifL, o cofator associado ao motivo PAS é o FAD (Hill et al, 1996).

A NifL responde aos níveis de oxigênio, por se tratar de uma proteína sensível ao potencial redox (Dixon e Kahn, 2004). Na ausência da proteína NifL, a proteína NifA não apresenta sensibilidade ao oxigênio (Lee et al, 1993). A proteína NifL parece inibir a proteína NifA diretamente em resposta ao estado redox do cofator FAD ligado em sua região N-terminal. A NifL apenas permite a atividade da proteína NifA na ausência de oxigênio, quando a flavina se encontra no estado reduzido (Hill et al, 1996; Schmitz, 1997; Macheroux et al, 1998). A forma reduzida da proteína NifL parece favorecer a associação desta com a membrana, resultando no seqüestro da NifL, permitindo que a NifA citoplasmática ative os genes *nif*. Na presença de O₂, a NifL parece ser diretamente oxidada, o que leva a sua dissociação da membrana (Klopprogge et al, 2002).

Ainda não está completamente claro como ocorre a transferência de elétrons para o grupamento flavina da proteína NifL. Grabbe e colaboradores (2001) mostraram que a proteína regulatória Fnr, que funciona como um sensor inicial de oxigênio, parece ser necessária para inibição de NifA por NifL em resposta aos níveis de oxigênio. Posteriormente, a atividade da proteína NifA de *Klebsiella pneumoniae* foi testada em estirpes de *Escherichia coli* mutantes em genes que codificam para proteínas integrantes das cadeias respiratórias aeróbicas e anaeróbicas (Grabbe e Schmitz, 2003). Os resultados indicaram que a proteína NifL parece ser reduzida pelo pool de quinonas reduzidas pela cadeia respiratória anaeróbica (Grabbe e Schmitz, 2003). A hipótese formulada pelos autores é que, em condições de anaerobiose, Fnr ativa a transcrição de

oxidoredutases ligadas à membrana, levando a uma razão quinol/quinona que permite a transferência de elétrons para a NifL (Grabbe e Schmitz, 2003). Nessas condições, para que a forma reduzida não exercesse um efeito inibitório sobre NifA, a proteína NifL reduzida se associaria com a membrana, resultando no seqüestro da NifL, permitindo que a NifA citoplasmática ativasse os genes *nif*. Na presença de O₂, a NifL seria oxidada direto pelo O₂ e dissociaria da membrana (Grabbe e Schmitz, 2003).

A proteína NifL de *Azotobacter vinelandii* também responde a adenosina-nucleotídeos. Na presença de ATP e ADP, mas não de AMP, a atividade inibitória da NifL desse microrganismo aumenta (Dixon, 1998). Eydmann e colaboradores observaram que a adição de um sistema de geração de ATP previne a inibição na ausência de oxigênio (Eydmann et al, 1995). Por isso, acredita-se que a inibição ocorra devido à formação de ADP pela atividade catalítica da proteína NifA. Então, ADP parece ser um efetor da atividade da proteína NifL (Eydmann et al, 1995). A presença de ADP provavelmente potencializa a sensibilidade da proteína NifL aos níveis redox, tendo em vista que até a forma reduzida da proteína, em condições anóxicas, responde à presença de ADP.

Além de inibir a proteína NifA em resposta aos níveis de oxigênio, a proteína NifL também funciona como um anti-ativador em resposta aos níveis de nitrogênio fixado. Mutações no gene *nifL* inativaram a resposta da ativação da transcrição dos genes *nif* em resposta aos níveis de nitrogênio fixado (Bali et al, 1992), sugerindo que a NifL age como um sensor de nitrogênio (Dixon, 1998). A informação quanto ao status de nitrogênio na célula é transferida à proteína NifL pelo sistema Ntr, via proteínas PII (Martinez-Argudo, 2004a). Em *Klebsiella pneumoniae*, mutantes *glnK* apresentam a proteína NifA inativada constitutivamente pela proteína NifL. Esse resultado indica que GlnK parece ser necessária para impedir que NifL iniba NifA em condições de baixas concentrações de nitrogênio fixado (He et al, 1998; Jack et al, 1999). Stips e colaboradores (2004) mostraram que em condições limitantes de nitrogênio em *Klebsiella pneumoniae* forma-se um complexo ternário GlnK-NifL-NifA, com baixas quantidades de GlnK. Além disso, esses autores encontraram evidências de que em anaerobiose, mas na presença de amônia ocorre síntese de GlnK

independente de NtrC, o que inibe a formação do complexo NifL-NifA (Stips et al, 2004). Esses resultados levaram os autores a propor que o complexo GlnK-NifL-NifA é uma estrutura de transição e, em condições limitantes de nitrogênio, GlnK interage com o complexo NifL-NifA, resultando em sua dissociação (Stips et al, 2004).

Outros resultados sugerem que o estado de uridililação de GlnK de *Azotobacter vinelandii* parece ser importante para a formação ou não do complexo (Dixon e Kahn, 2004). Mutações em *glnD* de *Azotobacter vinelandii*, que geram proteínas com uma atividade de uridililtransferase diminuída, impedem a transcrição dos genes *nif*. O fenótipo dessas mutações pode ser revertido com uma segunda mutação no gene *nifL*, indicando que NifL inibe NifA constitutivamente nos mutantes *glnD* (Colnaghi et al, 2001; Contreras et al, 1991). Reforçando essa hipótese, Rudnick e colaboradores (2002) mostraram que a proteína GlnK de *Azotobacter vinelandii*, contendo a mutação Y51F, que não é uridililada por GlnD em nenhuma situação, também leva a uma inibição da proteína NifA pela proteína NifL de forma constitutiva. Experimentos *in vitro* mostraram que GlnK não uridililada interage com NifL de *Azotobacter vinelandii* para inibir a atividade da proteína NifA, e essa interação não acontece quando GlnK está uridililada (Little et al, 2002). A interação de GlnK com NifL de *Azotobacter vinelandii* também foi detectada em experimentos *in vivo* (Money et al, 1999). O domínio PAS no N-terminal da proteína NifL de *Azotobacter vinelandii* parece não ser importante para a sensibilidade aos níveis de nitrogênio fixado e o domínio C-terminal parece ser o responsável por interagir com GlnK e formar o complexo ternário GlnK-NifA-NifL (Little et al, 2002). Portanto, parecem existir várias diferenças no mecanismo pelos quais o sistema NifL-NifA de *Azotobacter vinelandii* e *Klebsiella pneumoniae* respondem ao nitrogênio fixado. Em *Klebsiella pneumoniae* a proteína GlnK é importante para garantir que a proteína NifL não interaja com a proteína NifA em condições limitantes de nitrogênio. Em *Azotobacter vinelandii*, a forma não uridililada de GlnK é importante para interagir com a proteína NifL para inibir a proteína NifA em resposta a altos níveis de nitrogênio fixado.

1.5.2.2 Controle da atividade da proteína NifA nas α e β -proteobactérias

Nas α e β -proteobactérias, como *Herbaspirillum seropedicae* (Souza et al, 1991a), a proteína NifL está ausente e, portanto, a proteína NifA deve responder a esses sinais ambientais por mecanismos diferentes.

A transdução dos sinais de nitrogênio fixado para a proteína NifA dos diazotrofos que não possuem a proteína NifL também ocorre via sistema Ntr (Dixon e Kahn, 2004). Em *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense* e *Rhodospirillum rubrum*, proteínas PII são necessárias para que proteína NifA tenha atividade (Souza et al, 1999; Benelli et al, 1997; Zhang et al, 2004; Arsene et al, 1996; Noindorf, 2006). Araújo e colaboradores (2004) mostraram que a outra proteína do tipo PII de *Azospirillum brasilense*, GlnZ, não substitui GlnB na ativação de NifA em resposta aos níveis de nitrogênio. Estirpes de *Azospirillum brasilense* *glnD*⁻ e *glnB* que codifica para uma proteína mutante no aminoácido Tyr 51, que é o sítio para uridililação de GlnB por GlnD, apresentam fenótipo Nif⁻ (Arsene et al, 1999). Esse resultado sugere que GlnB uridililada é responsável por liberar a proteína NifA da repressão exercida pelos níveis de amônia (Arsene et al, 1999; Van Dommelen et al, 2002). Em *Rhodobacter capsulatus* e *Azorhizobium caulinodans* a proteína GlnB parece ter um papel diferente, tendo em vista que na sua ausência a proteína NifA é expressa de forma constitutiva, perdendo a regulação por nitrogênio (Michel-Reydellet e Kaminski, 1999; Drepper et al, 2003). Pawlowski e colaboradores mostraram em ensaios de duplo-híbrido que GlnB e GlnK interagem diretamente com a proteína NifA de *Rhodobacter capsulatus* (Pawlowski et al, 2003).

Souza e colaboradores (1999) mostraram que o domínio N-terminal da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* parece ser o responsável pela recepção do sinal da presença de nitrogênio. Em *Azospirillum brasilense*, a proteína NifA truncada na região N-terminal perde a regulação por nitrogênio, sendo ativa tanto na presença de amônia, quanto na ausência de GlnB (Arsene et al, 1996). Esse resultado sugere que GlnB pode ser necessária para ativar a proteína NifA antagonizando o efeito inibitório do N-terminal sobre os

outros dois domínios. Paschen e colaboradores (2001) construíram proteínas NifA de *Rhodobacter capsulatus* mutantes e analisaram suas atividades em resposta à concentração de nitrogênio fixado. Esse trabalho mostrou que a mutação L66Q gerou uma proteína NifA tolerante à amônia. Uma combinação dessa mutação com a K531T, no domínio C-terminal, resultou em um fenótipo semelhante, enquanto que a proteína NifA contendo apenas a mutação K531T não apresentou atividade em nenhuma condição (Paschen et al, 2001). Portanto, a mutação no resíduo Leucina 66 é capaz tanto de conferir tolerância a amônia a proteína NifA, quanto de suprimir o fenótipo negativo da mutação no aminoácido lisina 531. Este trabalho também mostrou que mutações na região interdomínio (I460F e E477Q) geraram proteínas NifA insensíveis à presença de amônia (Paschen et al, 2001). Esses resultados sugerem fortemente que os aminoácidos mutados podem participar de interações intra ou intermoleculares do domínio N-terminal com os outros domínios, modulando a atividade desses em resposta à presença de amônia. Reforçando essa hipótese, Monteiro e colaboradores (1999b e 2001) mostraram que a proteína NifA N-truncada de *Herbaspirillum seropedicae* tem sua atividade catalítica inibida pelo domínio N-terminal expresso separadamente, indicando que a regulação do N-terminal sobre os outros domínios pode ocorrer em *trans*. Experimentos posteriores sugerem que o resíduo Tirosina 18 do domínio N-terminal da proteína NifA de *Azospirillum brasilense* parece ser essencial para regulação da atividade da proteína NifA via GlnB (Arsene et al, 1999). Chen e colaboradores construíram proteínas NifA de *Azospirillum brasilense* mutantes nos aminoácidos Tirosina 18 e ou Tirosina 53, ambos substituídos por Fenilalanina (Chen et al, 2005). As proteínas com mutação em apenas um dos dois aminoácidos ainda interagem com GlnB (Chen et al, 2005). No entanto, a proteína NifA duplo mutante apresentou uma atividade alta, e testes de duplo híbrido não foram capazes de detectar interação entre essa proteína e a GlnB (Chen et al, 2005). Esses resultados indicam que a proteína GlnB pode interagir diretamente com a proteína NifA, e os aminoácidos Tyr 18 e Tyr 53 estariam envolvidos no contato entre a proteína NifA e a proteína GlnB.

Nos diazotrofos em que a proteína NifL está ausente, a proteína NifA possui um motivo com quatro cisteínas conservadas, localizadas no domínio central e

na região interdomínios existente entre os domínios central e C-terminal (Fischer, 1994). Como esse motivo se encontra conservado apenas nos organismos que não possuem proteína NifL e é importante para a manutenção da atividade da proteína NifA, acredita-se que ele possa ser o sítio de sensibilidade ao oxigênio da proteína NifA (Fischer et al, 1988; Fischer et al, 1989). Fischer e colaboradores (1988) demonstraram que íons ferro são importantes para a atividade da proteína NifA de *B. japonicum*. Resultado semelhante também foi encontrado por Souza e colaboradores (1999) para a NifA de *Herbaspirillum seropedicae*. Esses resultados indicam que o motivo conservado de cisteínas seja um sítio para a ligação de íons ferro, e a atividade da proteína NifA poderia ser modulada pelo estado de oxidação desses íons. De fato, o motivo conservado de cisteínas encontrado na proteína NifA dos diazotrofos das α e β proteobactérias tem similaridade com outros motivos de potencial ligação de metais de outras proteínas regulatórias (Fischer, 1994). A hipótese formulada é que em baixas concentrações de oxigênio o ferro reduzido possa ser coordenado com a proteína NifA através do motivo de cisteínas, possibilitando o posicionamento correto dos motivos central e C-terminal. Na presença de oxigênio, o ferro na forma oxidada não poderia coordenar com o motivo de cisteínas, resultando numa proteína NifA inativa (Fischer et al, 1988). No entanto, o ferro pode não ter um efeito direto na proteína NifA. Monteiro e colaboradores (2003a) demonstraram que a proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* não tem atividade em estirpes de *Escherichia coli* mutantes no gene *fnr*, que codifica para a proteína ativadora de transcrição Fnr, que funciona como uma sensora primária de oxigênio, e contém ferro. Portanto, a diminuição da atividade da NifA em resposta a deprivação de ferro observada por Souza e colaboradores (1999) pode ser causada pela diminuição da atividade da proteína Fnr ou por um efeito direto na proteína NifA.

Para compreender o mecanismo pelo qual a proteína NifA de *H. seropedicae* é inativada em resposta ao oxigênio é necessário entender qual é o papel do motivo conservado de 4 cisteínas contido no domínio central e região interdomínios da proteína. Para contribuir com esse entendimento, o motivo de cisteínas foi mutagenizado e a atividade das proteínas mutantes foi avaliada.

2. Objetivos

- Mutagenizar separadamente as 4 cisteínas do motivo conservado contido no final do domínio Central e região inter-domínios;
- Determinar o fenótipo de ativação de transcrição das proteínas NifA mutantes;
- Complementar a estirpe SmR54 de *H. seropedicae* (*nifA*-) com o plasmídeo pLAFR3.18 expressando a proteína NifA de *H. seropedicae*.
- Analisar a estrutura da proteína NifA de *H. seropedicae* *in silico*.

3. Materiais e métodos

3.1 Bactérias e plasmídeos

TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Estirpe ou plasmídeo	Fenótipo e/ou genótipo	Referência
Estirpes de <i>E. coli</i>		
BL21 (DE3) pLysS	<i>hsdS gal (λclts 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i> (produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs)	Sambrook et al, 1989.
JM109 (DE3)	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i> (JM109 produtora da RNA polimerase do fago T7)	Sambrook et al, 1989.
Top10	<i>F' mcrA Δ(mvr – hrd RMS – mcrBC) φ 80 lacZ ΔML5 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara – leu) 7697 galU galK rpsL (Sm^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
Estirpes de <i>H. seropedicae</i>		
SmRI	Sm ^R , Nif ⁺ .	Souza et al, 1995.
SmR54	Sm ^R , Km ^R , Nif ⁻ , <i>nifA::Km</i>	Souza et al, 1995.

Plasmídeos		
pET28a	Vetor de expressão. Expressa a proteína de fusão com His-Tag/ promotor T7. Km ^R	Novagen
pRAM1	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> subclonada no pET28a/Km ^R	Monteiro et al, 1999.
pRAM2	Contém a sequência codificadora dos domínios central e C-terminal da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> subclonada no pET 28a/Km ^R	Monteiro et al, 1999.
pT7-7	Vetor de expressão/ promotor T7. Amp ^R	Tabor e Richardson, 1985.
pRAM1T7	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> subclonada no vetor pT7-7/ Amp ^R	Cedido por Rose Adele Monteiro. Dados não publicados.
pRAM2T7	Contém a sequência codificadora dos domínios central e C-terminal da proteína NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Monteiro, 2001.
pDK7	Vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> . Cm ^R	Kleiner et al, 1988

pLAFR3.18	Cm ^R , Tc ^R , Mob ⁺ , vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ18R.	Souza et al, 1999.
pCR2.1	Vetor de clonagem/ Amp ^R , Km ^R .	Invitrogen
pMAO1	Contém o Central + C-terminal C414S da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> subclonada no pET 28a/Km ^R	Este trabalho
pMAO2	Contém o Central + C-terminal C426S da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> subclonada no pET 28a/Km ^R	Este trabalho
pMAO3	Contém o Central + C-terminal C446S da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> subclonada no pET 28a/Km ^R	Este trabalho
pMAO4	Contém o Central + C-terminal C451S da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> subclonada no pET 28a/Km ^R	Este trabalho
pRAMM1	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> subclonada no vetor pLAFR3.18.	Este trabalho
pRT22	<i>nifH</i> (<i>K. pneumoniae</i>):: <i>lacZ</i> / Cm ^R	Tuli e Merrick, 1988.

3.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura líquidos que foram utilizados para o cultivo das estirpes de *Escherichia coli* foram o Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al, 1989), Luria Bertani Agar (LA) (Sambrook et al, 1989), Nitrogen-Free Davis e Mignoli (NFDM) (Cannon et al, 1974), SOC e SOB (Sambrook et al, 1989).

O meio LB possui a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

Para a obtenção do meio LA, usado para cultivo em meio sólido, adicionou-se 15 g/L de ágar ao meio LB.

O meio SOB possui a seguinte composição:

	gramas/litro
Triptona	20
NaCl	0,6
KCl	0,186

O meio SOC foi obtido adicionando-se glucose 3,6 g/L, MgCl_2 0,94 g/L e MgSO_4 1,2 g/L ao meio SOB.

O meio NFDM tem a seguinte composição:

	gramas/litro
MgSO_4	0,1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025

No momento do uso, foram adicionados no meio 20 gramas por litro de glucose, 12,06 gramas por litro de K_2HPO_4 e 3,4 gramas por litro de KH_2PO_4 .

Para cultivo das estirpes de *H. seropedicae*, foi utilizado o meio NfbHP-Malato (Klassen et al, 1997). A composição do NfbHP-Malato é:

	gramas/litro
MgSO ₄ .H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	2x10 ⁻²
Ácido nitrilo triacético	5,6x10 ⁻²
FeSO ₄ .7H ₂ O	2x10 ⁻²
Biotina	1x10 ⁻⁴
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	2x10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	2,4x10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8x10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	8x10 ⁻³
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4x10 ⁻⁴
Ácido málico	5

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH₄Cl (cloreto de amônio) 20 mmol/L ou glutamato 0,5 mmol/L (ensaio da nitrogenase). As soluções de fosfato (159,4 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄), cloreto de amônio e de glutamato foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio no momento de uso. Quando completo, o meio de cultura apresentava pH 6,8, e passou a ser denominado NFbHPN. O meio NFbHPN sólido foi obtido adicionando-se ágar (15g/L) ao meio líquido.

3.3 Antibióticos

Os antibióticos foram adicionados ao meio, de acordo com a resistência da estirpe ou do vetor. Os antibióticos utilizados foram:

	Concentração (µg/mL)
Canamicina	50 (<i>E. coli</i>) / 500 (<i>H. seropedicae</i>)

estreptomicina	80
ácido nalidíxico	5
ampicilina	250
tetraciclina	10
cloranfenicol	30

As soluções de antibióticos foram preparadas segundo Sambrook et al, 1989, e mantidas a 4°C.

3.4 Manipulação do DNA

As reações de ligação, restrição e PCR foram realizadas nas condições específicas para a atividade máxima de cada enzima, de acordo com orientação do fabricante.

3.4.1 Transformação bacteriana

Para realizar a transformação bacteriana foram feitas células eletrocompetentes. Para isso, um pré-inóculo de 3 mL da célula foi crescido sob agitação durante a noite, em meio LB com os antibióticos adequados. O inóculo foi feito a partir de 400 µL de pré-inóculo em 40 mL de meio SOB, em frasco erlenmeyer de 250 mL e crescido até atingir DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. A cultura foi mantida por 30 minutos no gelo e centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. As células foram lavadas duas vezes em água bidestilada gelada estéril e uma vez em glicerol 15% gelado. Toda a manipulação foi feita no gelo. As células eletrocompetentes foram mantidas a –70°C em alíquotas de 40 µL.

Para a eletroporação, 1 a 2 µL de DNA plasmidial (aproximadamente 20 ng) foram adicionados a 40 µL de células eletrocompetente e a mistura transferida cuidadosamente para as cubetas de eletroporação. As células foram submetidas a um rápido pulso elétrico de 10 Kv/cm (4 KΩ, 330 µF), e em seguida foram ressuspensas em meio SOC sob agitação a 37°C, durante 1 hora.

Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio sólido seletivo contendo os antibióticos apropriados.

3.4.2 Purificação de DNA plasmidial

O isolamento e purificação do DNA plasmidial foi feito seguindo o método de lise alcalina descrito por Sambrook e colaboradores (1989). 1,5 mililitros de uma cultura de células crescidas durante a noite foram centrifugadas durante 1 minuto a 13000 rpm. O meio sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspenso em 200 µL de tampão GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl pH 8,0 25 mmol/L). A lise foi realizada adicionando-se 200 µL de uma solução contendo NaOH 0,2 mol/L e 1% de SDS. Essa mistura foi homogeneizada por inversão. O DNA cromossomal, proteínas e o SDS foram precipitados por adição de 200 µL de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 mol/L. Essa mistura foi homogeneizada por inversão e mantida por 10 minutos em banho de gelo. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm, e o sobrenadante contendo o plasmídeo foi separado em outro tubo, descartando-se o precipitado. A essa solução foi adicionado 200 µL da mistura fenol:clorofórmio:álcool iso-amílico (25:24:1). A mistura resultante foi agitada para homogeneização e centrifugada por 15 minutos a 13000 rpm. A fase aquosa foi coletada e misturada a 0,6 volumes de isopropanol, com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 1 mililitro de etanol 70%, seco em estufa 37°C e dissolvido em 30 µL de água bidestilada autoclavada.

3.4.3 Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose ou ágar 1%, segundo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Os géis foram preparados com tampão TBE (Tris-base 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8,0) e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão. A corrida foi realizada entre 40 a 60V, durante um tempo que variava conforme a separação

desejada das bandas. O DNA foi visualizado, após tratamento do gel com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em transiluminador de luz ultravioleta. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema vídeo-imagem acoplado (UVP).

3.4.4 Purificação de DNA por eletroforese de baixo ponto de fusão

Para a purificação do produto de PCR obtido de acordo com o item 3.4.6, a amostra foi submetida a uma eletroforese em agarose de baixo ponto de fusão 1%. Uma alíquota de 5µL da amostra foi aplicada em um poço, e o restante da amostra em outro poço. Após a separação eletroforética, o gel foi cortado e apenas a linha contendo a alíquota de 5µL foi corada. A visualização da posição da banda de interesse nessa parte corada do gel foi usada para determinar a posição da parte não corada do gel a qual continha a maior parte da amostra. A região do gel correspondente a essa posição foi então recortada, e o DNA nela contida foi extraído através do kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification”, da Amersham Biosciences.

3.4.5 Sequenciamento de DNA

Todos os fragmentos obtidos após PCR mutagênica foram clonados no vetor pCR2.1 e seqüenciados para confirmar a presença da mutação e também para verificar se mutações inespecíficas não foram introduzidas durante o processo. Os primers utilizados para o sequenciamento foram o universal e reverso M13 (invitrogen).

O sequenciamento foi realizado através do método de terminação de cadeia (Sanger et al, 1977) e utilizando o seqüenciador automático ABI377 (Applied Biosystems). Nesse sistema, 4 cromóforos fluorescentes são utilizados como terminadores de cadeia, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção a Laser. As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o sistema ET terminator (GE Healthcare) e os parâmetros de amplificação foram definidos segundo análise dos oligonucleotídeos iniciadores. Como molde foram utilizados plasmídeos purificados através do método da lise alcalina, descrito no item 3.4.2.

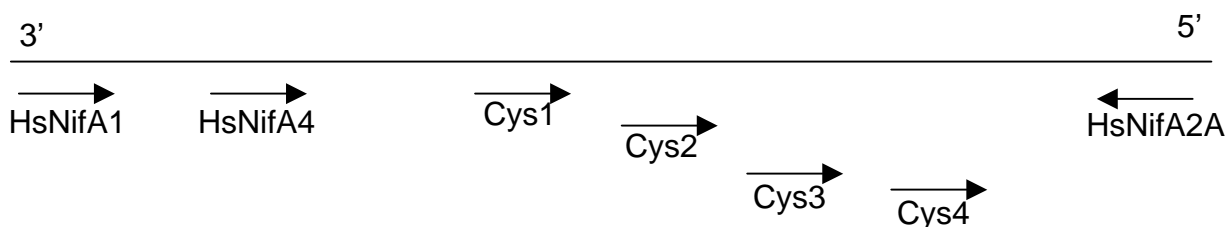
3.4.6 Mutagênese sítio-dirigida

Para a avaliação do papel do motivo de quatro cisteínas conservadas do domínio central e da região interdomínios da proteína NifA, foi realizado um processo de mutagênese em cada uma das cisteínas conservadas. Essas cisteínas foram trocadas pelo aminoácido serina, que é quimicamente semelhante a cisteína. Para a realização da mutagênese nos nucleotídeos específicos, duas reações de PCR em sequência foram utilizadas. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão apresentadas abaixo. Em vermelho são indicadas regiões que foram modificadas para a inserção do sítio de restrição para a enzima *Bam*HI, e a seqüência ATG, início de tradução, está mostrada em negrito. As modificações inseridas para a troca das cisteínas por serinas são mostradas em azul. Alguns oligonucleotídeos não possuem ATG, pois a tradução é iniciada no ATG do vetor. O alinhamento dos oligonucleotídeos à seqüência codificadora para a proteína NifA e seus domínios também é mostrado na lista. As posições dos nucleotídeos mostradas na lista correspondem à seqüência do gene *nifA*.

- | | |
|---|--|
| 1 – HsNifA1 5'-TAG <u>GGATCC</u> CAT ATG GCCACT-3' | N-terminal-NifA,
sentido 5', posição
-12 a 9 (Monteiro,
2001). |
| 2–HsNifA2A 5'-AGA <u>GATCC</u> TAGAACTTCTTGACCTCG-3' | C-terminal-NifA,
sentido 3', posição
1610 a 1636
(Monteiro et al,
1999a). |
| 3 – HsNifA4 5'-TC <u>GGATCC</u> GTAATCGGC-3' | N-terminal – domínio
central, sentido 5',
posição 598 a 615
(Monteiro, 2001). |

4 – Cys1 5'ATGATGAAT <u>AGC</u> TACTGGCCG3'	Central, sentido 5', posição 1231 a 1252.
5 – Cys2 5'CTGGAAAT <u>AGC</u> GTCGAGCGT3'	Central, sentido 5', posição 1268 a 1289.
6 – Cys3 5'CATTCTCC <u>AGC</u> CAGCAGAAC3'	Central, sentido 5', posição 1318 a 1339.
7 – Cys4 5'CAGAACAAA <u>AGC</u> CTGACCAAG3'	Região interdomínios, sentido 5', posição 1334 a 1355.

Figura 5 – Posição relativa dos oligonucleotídeos iniciadores no gene *nifA*



A posição relativa dos oligonucleotídeos iniciadores é mostrada. As setas apontam para o sentido da polimerização do gene.

A primeira reação de PCR foi realizada utilizando o plasmídeo pRAM1, que contém o gene *nifA*, como molde. A amplificação ocorreu a partir dos oligonucleotídeos iniciadores Cys 1, 2, 3 ou 4, dependendo da cisteína mutagenizada e o HsNifA2. O produto de PCR correspondia ao fragmento do

gene que codifica a partir do códon da cisteína mutagenizada até a extremidade C-terminal do gene *nifA*.

Após essa reação, o produto de PCR foi purificado por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão de acordo com o item 3.4.4 com o objetivo de eliminar os oligonucleotídeos iniciadores da primeira reação de PCR.

A segunda reação de PCR utilizou novamente o pRAM1 como molde. Um dos oligonucleotídeos iniciadores utilizado foi o produto de PCR do primeiro ciclo de amplificação, chamado de megaprimer, e o outro foi o HsNifA4, que anela na extremidade N-terminal do domínio central. O produto dessa PCR correspondia ao gene *nifA* N-truncado.

Para as reações de amplificação foi utilizado tampão 1X para PCR (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50mmol/L KCl), 0,2mmol/L dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 20ng de DNA molde em um volume final de 50 µL.

Para a confirmação da amplificação, o produto da reação de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito no item 3.4.3.

3.5 Ativação da transcrição *in vivo*

Os plasmídeos contendo o gene que codifica para a proteína NifA N-truncada e as proteínas mutantes, foram transformados na estirpe de *E. coli* JM109 (DE3), que não apresenta atividade de β-galactosidase, de acordo com o item 3.4.1. Além desses plasmídeos, também foi transformado o plasmídeo pRT22, que contém a fusão *nifH* (*K. pneumoniae*)::*lacZ*. Pré-inóculos foram crescidos em meio mínimo NFDM contendo 5% de fosfato, NH₄Cl 20mmol/L, meio LB 5% e os antibióticos adequados durante a noite a 37°C. Quatrocentos µL (10%) do pré-inóculo foram inoculados em 4 mL de meio mínimo NFDM contendo fosfato 5%, NH₄Cl 20mmol/L e IPTG para concentração final de 0,5 mmol/L. A D.O.₆₀₀ da cultura logo após o inóculo era em torno de 0,2. O ar contido na fase gasosa das culturas foi trocado pelo gás Argônio. Os inóculos foram incubados em

anaerobiose por 8h a 30°C. A atividade de β -galactosidase das culturas foi determinada em alíquotas de 100 μ L.

3.5.1 Atividade de β -galactosidase

Essa análise foi feita segundo Miller (1990). O meio de reação continha 900 μ L de tampão Z (Na_2HPO_4 60 mmol/L, NaH_2PO_4 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO_4 1mmol/L, β -mercaptoetanol 50mmol/L e SDS 0,1%), 25 μ L de clorofórmio e 100 μ L da cultura induzida de bactérias. Após mistura, o meio de reação foi incubado a 30°C por 10 minutos. Após esse período, a reação foi iniciada pela adição 200 μ L de solução de o-nitrofenil β -galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/L e após 30 minutos de incubação a 30°C a reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de Na_2CO_3 1 mol/L. Em seguida, foram realizadas as leituras de absorbância a 420 nm (o-nitrofenol) e 550 nm (turbidez da mistura) da reação e 600 nm (densidade celular) da cultura.

Os cálculos de atividade foram feitos segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade de } \beta\text{-Gal} = \frac{1000 (\text{DO}_{420\text{nm}} - 1,75 \times \text{DO}_{550\text{nm}})}{t \times V \times \text{DO}_{600\text{nm}}}$$

Onde:

t = tempo de incubação (minutos)

V = volume de células utilizadas (mL)

D.O. = Absorbância no comprimento de onda indicado.

A atividade de β -Gal é expressa em unidades Miller.

3.6 Quantificação de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Esse método colorimétrico é baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com proteínas. O sistema de reação continha

1mL da solução do corante (solução Bradford – 10 mg/L Coomassie Brilliant Blue G-205, 95% etanol e 85% ácido fosfórico para 1L de solução) e 100 µL da amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595 nm determinada. A curva padrão foi feita utilizando albumina de soro bovino como padrão, preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. O limite de sensibilidade do método é de 1 a 10 µg de proteína. Alternativamente a concentração de proteínas foi determinada por fluorescência, utilizando kit Quant-it Protein Assay Kit e fluorímetro Qubit, ambos da Invitrogen.

3.7 Ensaio da Nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método da redução do acetileno a etileno (Dilworth, 1966; Schollhorn e Burris, 1967). As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em frasco de 10 mL contendo 4 mL de meio NFbHP semi-sólido e 0,5 mmol/L de glutamato. Após a formação da película próxima à superfície do meio, os frascos foram fechados com rolhas de borracha e foi injetado acetileno puro na concentração equivalente à 10% da fase gasosa. As culturas foram incubadas por mais 1 hora a 30°C e alíquotas de 0,5 mL da fase gasosa foram coletadas e analisadas por cromatografia gasosa (cromatógrafo Varian modelo 2440D equipado com coluna Porapak N e detector de ionizador de chama; o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio super seco, fluxo de 20mL/min). A temperatura da coluna foi de 120°C e a do detector de 200°C. Como padrão foi utilizado etileno padrão 100ppm (White Martins). A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína total na cultura.

3.8 Eletroforese de proteínas

As eletroforeses de proteínas foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses de proteína realizadas foi de 12% e do gel de empilhamento foi de 4%. As eletroforeses foram realizadas

em sistema vertical seguindo orientação do fabricante (Hoefer). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH6,8, 5% de β -mercaptoetanol) e fervidas antes da aplicação. A voltagem da corrida variou de 100 a 200V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue.

3.9 Teste de expressão

Para verificar se as construções realizadas expressavam as proteínas desejadas, os plasmídeos construídos foram transformados na estirpe BL21 (DE3) de acordo com o item 3.4.1, e 3 colônias transformantes foram crescidas em 3 mL de LB durante a noite. Cem microlitros dessa cultura foram inoculados em 10 mL de LB. As células foram cultivadas a 37°C sob agitação constante até DO₆₀₀ próxima de 0,8. Neste ponto foi adicionado 0,5 mmol/L de IPTG, seguido de incubação sob agitação constante a 37°C por 3 horas. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. O meio sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspenso em 400 μ L de tampão contendo Tris-HCl 50mmol/L pH8,0 e NaCl 200mmol/L. As células foram então lisadas por sonicação em um sonicador Heat System equipado com microponeta, em banho de gelo, por 6 ciclos de 20 segundos, intercalados com 20 segundos de intervalo. Após dosagem de proteína da solução resultante, 10 μ g de proteína foram aplicados em gel de poliacrilamida e tiveram seu perfil eletroforético avaliado de acordo com o item 3.8.

3.10 “Western blot”

Para a realização dos experimentos de “Western blot”, 5 μ g de proteína foram separados por eletroforese em gel desnaturante e transferidas para membranas de PVDF (Hybond P – GE Healthcare) utilizando um sistema de transferência semi-seco.

3.10.1 Preparação das amostras para analisar a expressão das proteínas NifA mutantes nos extratos celulares

Para verificar a presença e o nível de expressão da proteína NifA nas culturas utilizadas para realização do ensaio da β -galactosidase, 12 mL dessas culturas foram centrifugadas, após o ensaio, e a massa de células precipitada foi ressuspensa em 200 μ L de tampão contendo Tris-HCl 50mmol/L pH8,0 e NaCl 200mmol/L. As células foram então lisadas por sonicação em um sonicador Heat System equipado com micropona, em banho de gelo, por 6 ciclos de 20 segundos, intercalados com 20 segundos de intervalo. A solução resultante foi utilizada para a realização do “Western blot”.

3.10.2 Transferência das proteínas para a membrana

Os tampões de transferência foram preparados usando soluções estoques com as seguintes concentrações: Tris base 0,5 mol/L pH10 e ácido capróico 0,4 mol/L. Foram utilizados 3 tampões, indicados abaixo:

Tampão A1:

	mL
Tris Base	150
Metanol	50
Água	50

Tampão A2:

Tris	12,5
Metanol	50
Água	187,5

Tampão C:

Tris	12,5
Ácido capróico	25
Água	162,5
Metanol	50

Inicialmente, a membrana foi ativada por 30 segundos em metanol. Após esse tempo ela foi mantida em água bidestilada. A placa do ânodo foi coberta com 2 camadas de papel filtro encharcadas com tampão A1. Sobre elas, foi colocada 1 camada de papel filtro encharcada com tampão A2, seguida da membrana ativada, previamente imersa no tampão A2. Após isso o gel de poliacrilamida contendo as proteínas foi colocado sobre a membrana. Sobre o gel foram colocadas 3 camadas de papel filtro encharcados em tampão C. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas do papel filtro e o sistema foi ligado a uma fonte de voltagem a 80 mA por 1 hora.

3.10.3 Tratamento da membrana

Todo o tratamento da membrana foi realizado com tampão TBST (2,42g/L Tris pH7,6, 8g/L NaCl, 1mL/L tween 20). Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com TBST contendo 5% de leite em pó desnatado a 4°C durante a noite. Após isso, a membrana foi lavada rapidamente com TBST e incubada com TBST contendo 1% de leite em pó desnatado e o anticorpo primário durante 1 hora. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-His (Invitrogen) na diluição 1:5000 ou anti-NifA na diluição 1:2000 (Monteiro, 2001). Para o anticorpo anti-NifA, extratos celulares totais de *E. coli* sonificados foram utilizados para bloquear possíveis interações inespecíficas do anticorpo com outras proteínas.

Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 4 vezes com o tampão TBST, sendo que a primeira lavagem foi de 15 minutos e as 3 subsequentes de 5 minutos. Durante esses tempos a membrana foi mantida sob agitação constante. Terminadas as lavagens a membrana foi incubada durante 1 hora com 10 mL de TBST contendo 1% de leite em pó desnatado e anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, no caso do anti-NifA, ou de rato, no caso do anti-

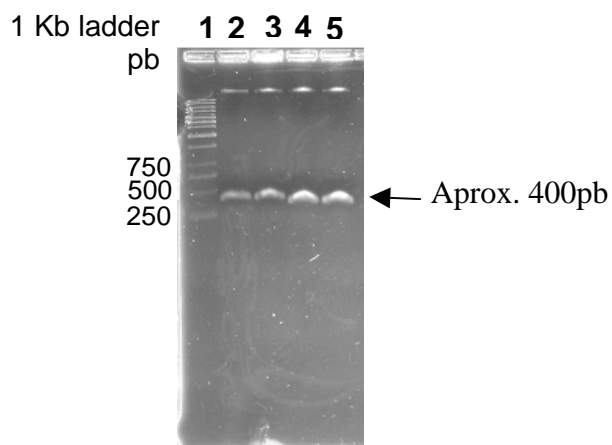
His, conjugados com a enzima peroxidase – GE Healthcare) na diluição de 1:5000. Após a incubação a membrana foi novamente lavada com TBST quatro vezes, sendo que uma vez durante 15 minutos, e 3 vezes durante 5 minutos. A membrana foi então submetida à etapa de revelação usando o sistema ECL Plus (GE Healthcare), de acordo com as orientações do fabricante. Para a revelação a membrana foi mantida em câmara escura e o resultado foi registrado utilizando uma câmera CCD, em um sistema vídeo-imagem acoplado (UVP).

4. Resultados e discussão

4.1 Mutagênese sítio dirigida do gene *nifA*

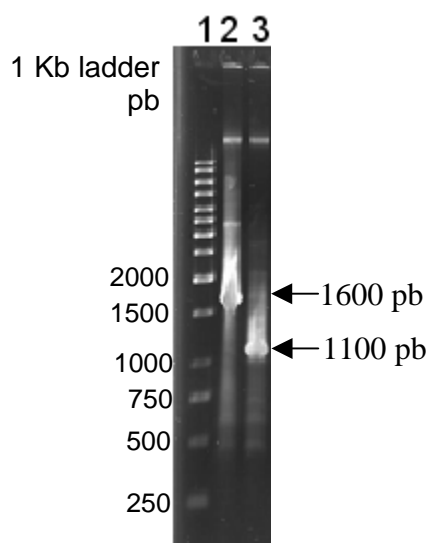
Para avaliar a importância das cisteínas nas posições 414, 426, 446 e 451, localizadas no final do domínio central e na região interdomínios, cada cisteína foi substituída por uma serina separadamente, como descrito no item 3.4.5. Os megaprimers foram amplificados com sucesso (Figura 6) e usados como oligonucleotídeos iniciadores do segundo passo de amplificação, juntamente com o oligonucleotídeo HsNifA1 ou HsNifA4 (Figura 7). Quando o oligonucleotídeo usado foi o HsNifA4, o gene resultante não continha a região codificante do domínio N-terminal ($\Delta NnifA$), enquanto que com o HsNifA1, o produto de PCR correspondia ao gene *nifA* inteiro. Para as etapas de clonagem e subclonagem mostradas adiante, apenas os genes que codificam para a proteína NifA N-truncada foram usados.

Figura 6 – Megaprimers amplificados



Gel de agarose 1% do produto de PCR obtido com os oligonucleotídeos iniciadores HsNifA2 e o primer mutagênico (Cys1, Cys2, Cys3 ou Cys4). A linha 1 corresponde marcador de pares de base 1Kb ladder, e as linhas subsequentes aos megaprimers amplificados. A seta mostra a posição dos amplificados. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz Ultra Violeta.

Figura 7 – Gene *nifA* mutante amplificado



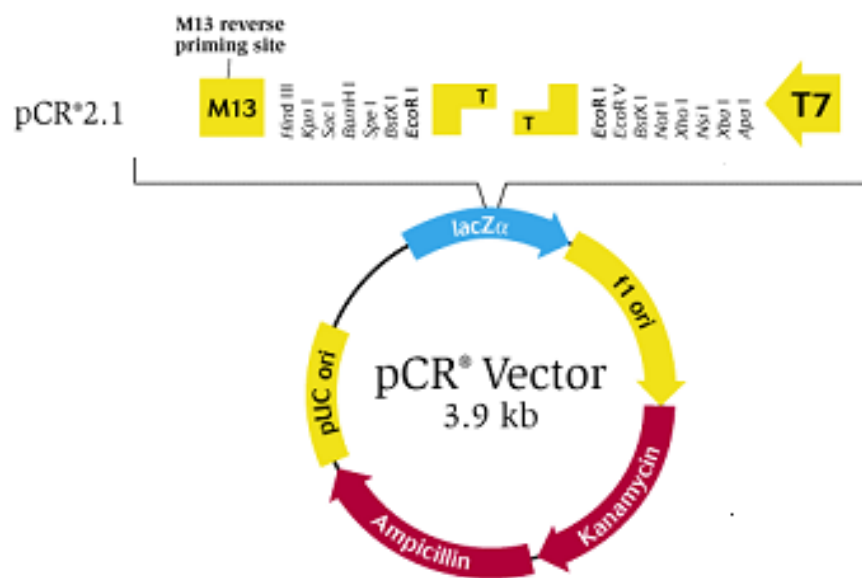
Gel de agarose 1% do produto de PCR obtido com o megaprimer e os oligonucleotídeos iniciadores HsNifA1 ou HsNifA4. A linha 1 corresponde marcador de pares de base 1Kb ladder, a linha 2 ao gene *nifA* inteiro amplificado, com 1600 pares de base e a linha 3 ao gene $\Delta NnifA$, com 1100 pares de base. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz Ultra Violeta.

4.2 Construção de plasmídeos recombinantes contendo seqüências codificadoras para as proteínas NifA mutantes

O produto da segunda reação de PCR (segunda etapa de mutagênese), correspondente ao gene $\Delta NnifA$ mutante em uma das cisteínas, foi clonado no vetor pCR2.1, da invitrogen (Figura 8). A enzima Taq DNA polimerase adiciona adeninas despareadas nas pontas do amplificado. O pCR2.1 possui timinas despareadas no sítio de clonagem, que anelam com as adeninas despareadas do produto de PCR, permitindo maior eficiência na ligação. Além disso, o sítio de clonagem encontra-se no interior de gene *lacZ α* , que codifica o peptídeo α da enzima β -galactosidase. Quando esse gene é expresso, o peptídeo α se combina com a subunidade β da enzima β -galactosidase, produzida pela célula, montando a holoenzima. Logo, se algum vetor fechado sem um inserto fosse transformado ele poderia ser diferenciado do clonado pela expressão da enzima

β -galactosidase. Isso foi feito adicionando-se X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo), que é substrato para a enzima β -galactosidase, nos meios onde foram plaqueadas as transformações das ligações. Quando a β -galactosidase hidrolisa X-gal forma-se um composto de cor azul e insolúvel. Dessa forma, as colônias contendo apenas o vetor fechado ficaram azuis, podendo ser diferenciadas das que continham vetores clonados com algum inserto.

Figura 8 – Vetor pCR2.1

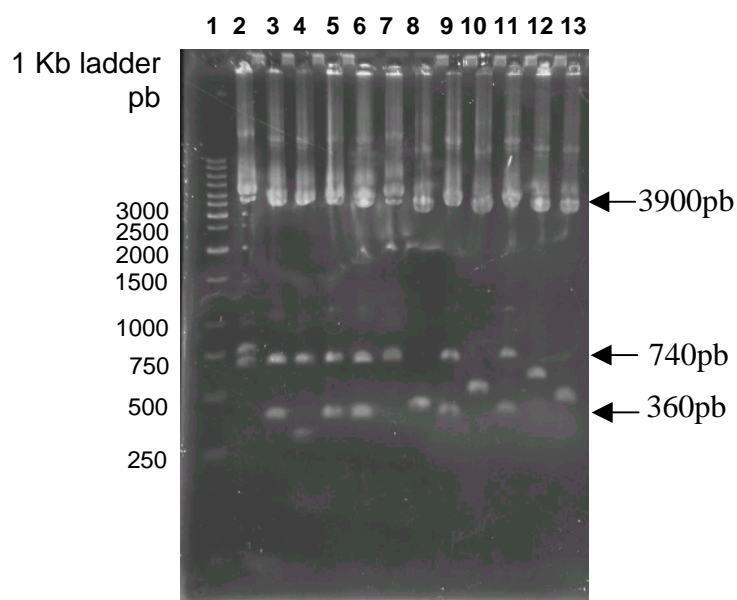


Mapa esquemático do vetor pCR2.1. No sítio de policlonagem são mostradas as timinas despareadas, usadas para clonagem do produto de PCR. O sítio de clonagem encontra-se no interior do gene *lacZα*. O vetor confere resistência aos antibióticos Ampicilina e Canamicina, que foram utilizados na seleção dos transformantes (Invitrogen).

As colônias brancas que cresceram no meio LA foram coletadas, crescidas em meio líquido, e o seu DNA plasmidial extraído conforme descrito no item

3.4.2. Para confirmar o sucesso da clonagem, os plasmídeos foram digeridos com a enzima *EcoRI*, e o perfil eletroforético da reação foi analisado. Como pode ser visto na figura 8, a digestão com a enzima *EcoRI* libera o fragmento clonado, separando o inserto do vetor. Além disso, o gene $\Delta NnifA$ é cortado uma vez por essa enzima, separando-o em um fragmento com 360 pares de base e outro 740 pares de base. Dessa forma o perfil eletroforético esperado dos clones corretos deveria conter uma banda com cerca de 3900 pares de base, correspondente ao vetor, outra com cerca de 740 pares de base e outra com cerca de 360 pares de base. A figura 9 mostra um exemplo dessa análise.

Figura 9 – Perfil eletroforético de clones em pCR2.1 digeridos com a enzima *EcoRI*



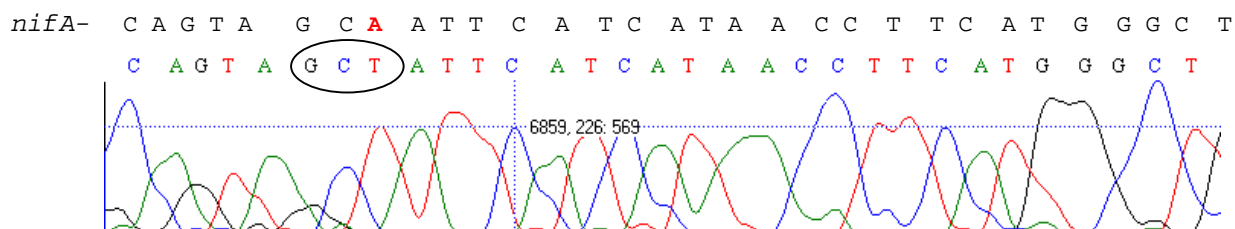
Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão dos clones com a enzima *EcoRI*. Na linha 1 é mostrado o marcador de pares de base 1Kb ladder, e nas linhas 3, 5, 6, 9 e 11 foi encontrado o padrão esperado, com 1 banda com 3900 pares de base, uma com 740 pares de base e outra com 360 pares de base, correspondendo, portanto, aos clones corretos. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz Ultra Violeta.

Os clones selecionados foram chamados de Cys1TA, Cys2TA, Cys3TA e Cys4 TA (série CysTA), dependendo da cisteína mutagenizada (Cys1 – cisteína 414; Cys2 – cisteína 426; Cys3 – cisteína 446; Cys4 – cisteína 451).

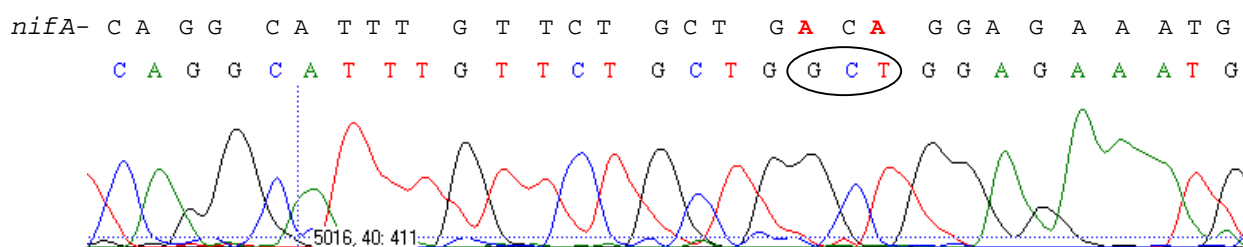
Os clones obtidos foram sequenciados para confirmar a mutação, com exceção do Cys2TA, que está sendo sequenciado (Figura 10). Uma vez confirmada a mutação nos clones Cys1TA, Cys3TA e Cys4TA, os fragmentos de interesse foram subclonados no vetor de expressão pET28a. Como os vetores pCR.2.1 e pET28a possuem resistência a canamicina, não era possível subclonar o gene diretamente. Para a primeira subclonagem, a série de plasmídeos CysTA foi digerida com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III, que libera o inserto clonado juntamente com uma pequena porção do vetor. Esse fragmento foi clonado no vetor pDK7, que possui resistência a cloranfenicol digerido com as mesmas enzimas, gerando os plasmídeos Cys1pDK7, Cys2pDK7, Cys3pDK7 e Cys4pDK7 (série CyspDK7), de acordo com a cisteína mutagenizada. Como o vetor pDK7 não possui sítio de ligação para ribossomo, não foi possível expressar o gene nessa construção.

Figura 10 – Eletroforograma da região mutagenizada do gene *nifA*

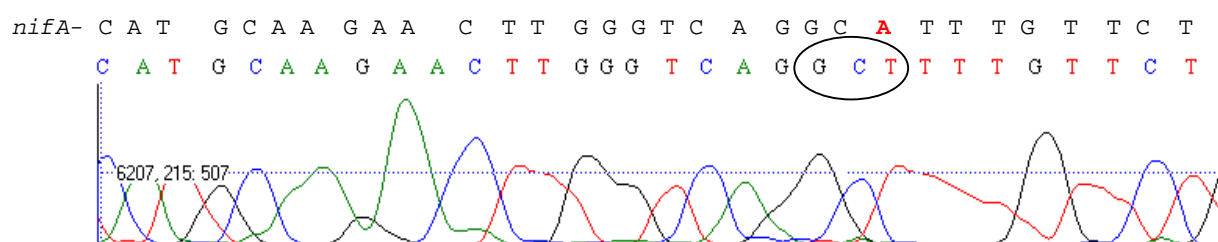
Cys 1:



Cys 3:



Cys 4:



Os eletroforogramas foram obtidos como descrito em Materiais e Métodos. As bases circuladas indicam os códons modificados pela mutagênese. Acima da sequência do eletroforograma está a sequência do gene *nifA*. As bases mutagenizadas no gene *nifA* estão destacadas. As bases do códon que codifica a cisteína 1 estão nas posições 1240-1243, a cisteína 3 nas posições 1339 a 1342 e a cisteína 4 nas posições 1350 a 1353.

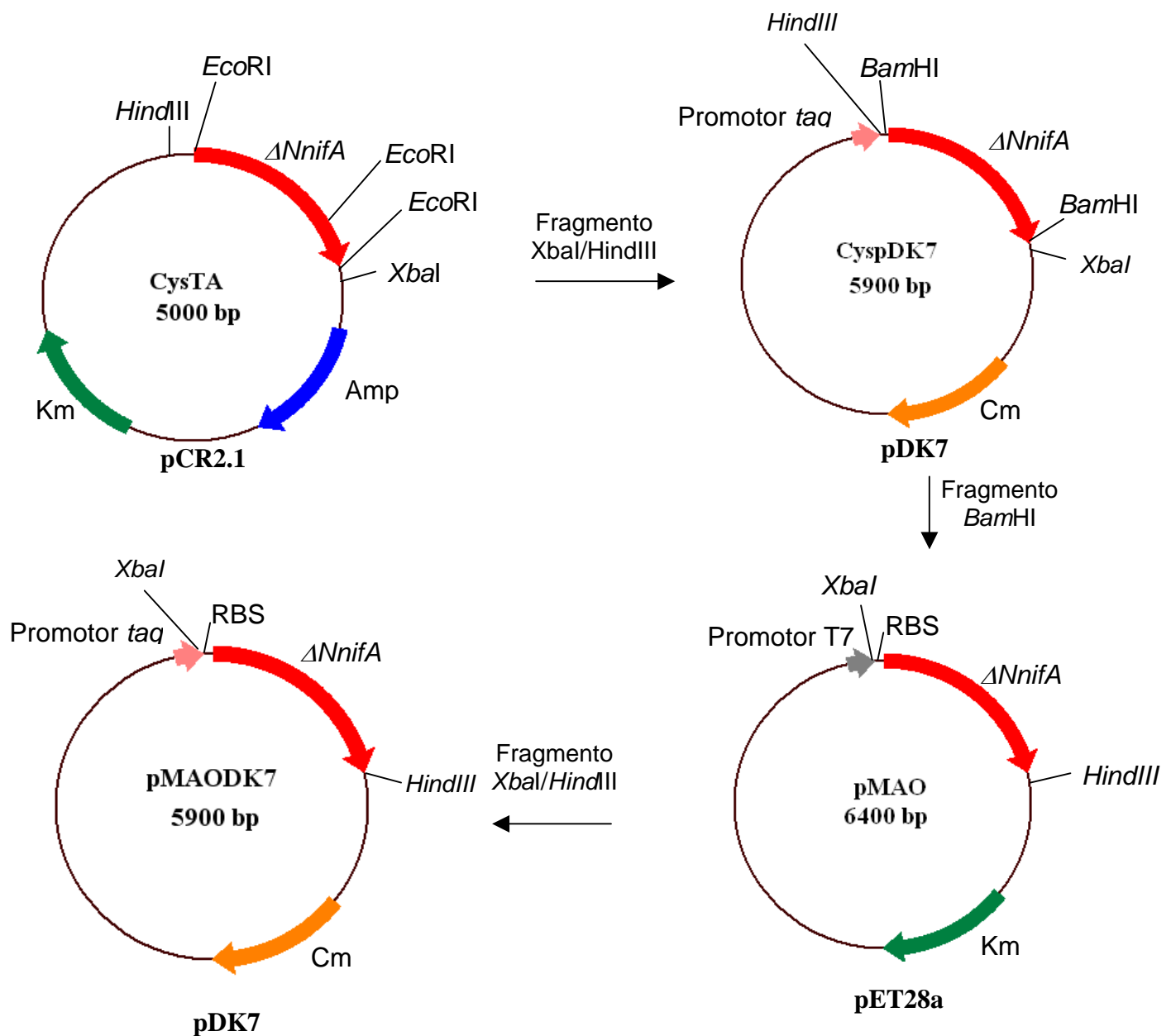
Para a clonagem em pET28a, a série de plasmídeos CyspDK7 foi digerida com a enzima de restrição *Bam*HI, que corta a sequência dos dois oligonucleotídeos iniciadores usados nas pontas dos genes mutantes, conforme mostrado no item 2.4.5. Dessa forma, a digestão dos plasmídeos CyspDK7 com a enzima *Bam*HI liberou o gene $\Delta NnifA$ com extremidades coesivas *Bam*HI. Para a ligação, o vetor pET28a foi aberto com a mesma enzima. Como as duas extremidades tinham a mesma ponta coesiva o inserto poderia entrar em qualquer uma das orientações.

Para verificar a orientação da clonagem no vetor pET28a, os clones obtidos foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI. Essa enzima corta o vetor uma vez, em um ponto próximo ao inserto, e uma vez o inserto. O perfil eletroforético da digestão foi analisado para verificar a orientação da clonagem. Caso o gene estivesse na orientação correta seria esperado encontrar um fragmento com o tamanho do vetor mais cerca de 750 pares de base do inserto (cerca de 6000 pares de base) e outro com cerca de 400 pares de base do inserto.

Os clones corretos selecionados foram chamados de pMAO1, pMAO2, pMAO3 e pMAO4 (série pMAO), de acordo com a cisteína mutagenizada. Para que os genes mutantes pudessem ser expressos a partir do promotor *tac*, um novo passo de subclonagem foi realizado. O objetivo dessa subclonagem é expressar as proteínas mutantes no vetor pDK7, utilizando o sítio de ligação de ribossomo do vetor pET28a. Para isso, a série de plasmídeos pMAO foi digerida com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III, liberando o inserto que foi clonado no vetor pDK7 cortado com as mesmas enzimas, gerando a série de plasmídeos pMAODK7. Essa construção deverá ser importante para experimentos futuros, como expressão das proteínas em células sem a RNA polimerase T7 ou com fusão *nifH::lacZ* que confere resistência a canamicina.

O esquema de clonagem está mostrado na figura 11.

Figura 11 – Esquema de clonagem dos genes mutantes



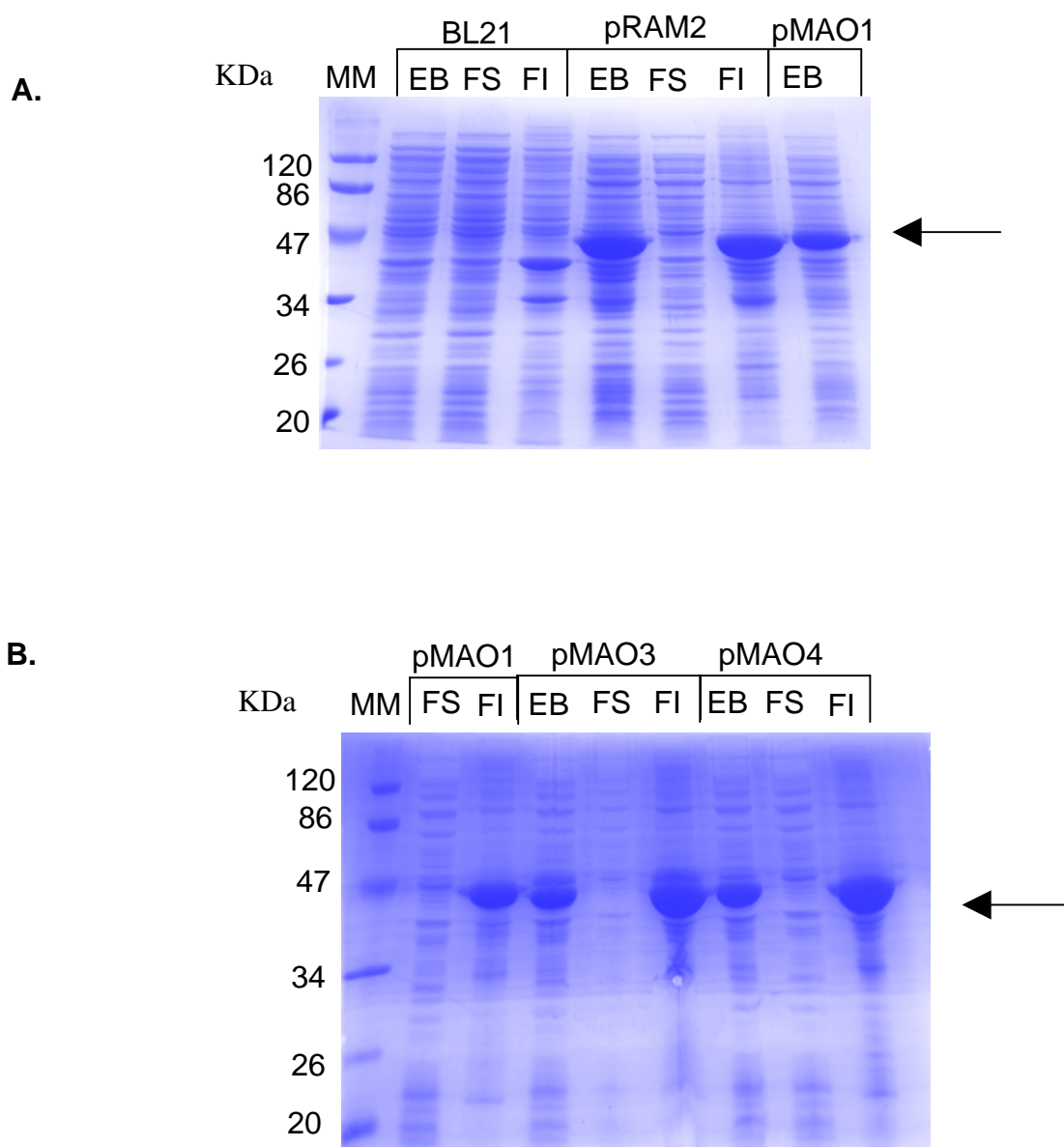
O produto de PCR foi clonado no vetor pCR2.1. O plasmídeo então foi digerido com as enzimas *XbaI* e *HindIII* e o fragmento de cerca de 1200 pares de base foi clonado no vetor pDK7. O fragmento correspondente ao gene *nifA*, com cerca de 1100 pares de base foi retirado do pDK7 com a enzima *BamHI* e clonado no vetor pET28a. O fragmento *XbaI/HindIII* desses plasmídeos foi então clonado novamente no vetor pDK7, levando o sítio de ligação de ribossomo do vetor pET28a.

4.3 Teste de expressão das proteínas mutantes

A proteína NifA de fusão His-tag-Central+C-terminal, quando superexpressa em *E. coli* estirpe BL21 (DE3) a partir do plasmídeo pRAM2 a 30°C está presente nas frações insolúvel e solúvel do extrato celular (Monteiro et al, 1999a). Para verificar o padrão de expressão das proteínas NifA His-tag mutantes, a expressão foi induzida com IPTG por 3 horas a 30°C. Os géis de poliacrilamida obtidos após corrida eletroforética do extrato protéico de *E. coli* BL21 (DE3) contendo as diferentes construções são mostrados nas figuras 12 e 13.

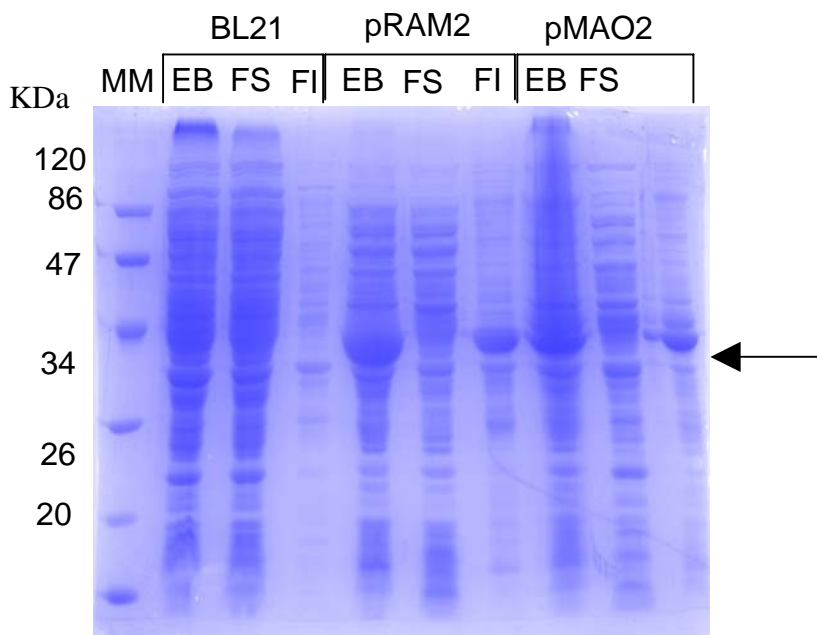
A análise dos géis permite concluir que as proteínas NifA mutantes foram expressas, com cerca de 41 KDa, coincidindo com o tamanho da proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pRAM2. No entanto, grande quantidade da proteína está presente na fração insolúvel. Para aumentar a solubilidade da proteína, novos testes precisam ser feitos, variando as condições de expressão. É possível que o uso de lactose como indutor, ao invés de IPTG, aumente a solubilidade das proteínas, como observado anteriormente por Monteiro e colaboradores (2000). A proteína NifA de outros organismos também apresenta grande insolubilidade, sendo encontrada apenas uma pequena parte na fração solúvel, como em *Azotobacter vinelandii* (Austin et al, 1994) e *Klebsiella pneumoniae* (Austin e Merrick, 1988).

Figura 12 – Teste de expressão das proteínas NifA Cys1, NifA Cys3 e NifA Cys4



Teste de expressão das proteínas Δ NifACys1, Δ NifACys3 e Δ NifACys4. As setas marcam a posição da proteína NifA N-truncada. As células crescidas foram induzidas com IPTG 0,5 mmol/L, sonicadas e o padrão de proteínas foi analisado por eletroforese em gel de poliácridamida 12%. Na foto, são mostrados os extrato bruto (EB), fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI) do controle e da célula transformada com cada plasmídeo. Na primeira linha dos dois géis está o marcador de massa molecular (MM), com as respectivas massas em KDa.

Figura 13 - Teste de expressão da proteína NifA Cys2



Teste de expressão da proteínas Δ NnifACys2. A seta marca a posição da proteína NifA N-truncada. As células crescidas foram induzidas com IPTG 0,5 mmol/L, sonificadas e o padrão de proteínas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Na foto, são mostrados os extrato bruto (EB), fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI) do controle e da célula transformada com cada plasmídeo. Na primeira linha está o marcador de massa molecular (MM), com as respectivas massas em KDa.

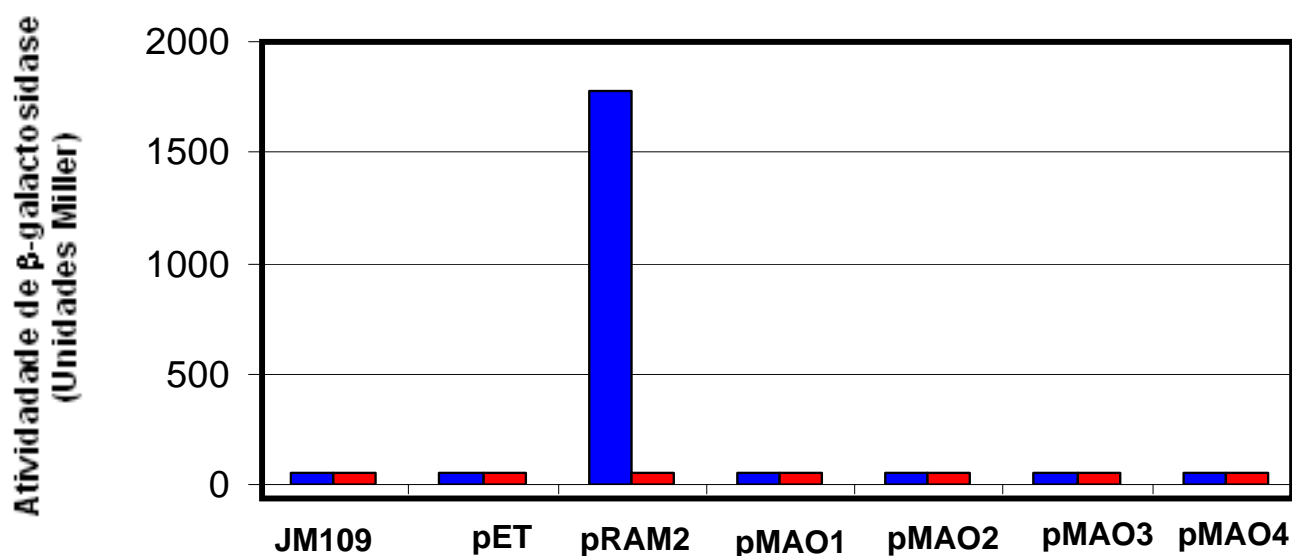
4.4 Atividade transcricional da proteínas de fusão mutantes

A atividade das proteínas mutantes foi testada na estirpe JM109 (DE3) de *E. coli*. Essa estirpe é produtora da RNA polimerase do fago T7 e, portanto, pode ser usada para expressar as construções das proteínas mutantes, além de não possuir atividade de β -galactosidase. Para testar a capacidade de ativação de transcrição das proteínas mutantes, elas foram expressas em células da estirpe JM109 (DE3) transformadas anteriormente com o plasmídeo pRT22. Esse plasmídeo contém a região codificadora do gene *lacZ*, que codifica para a

enzima β -galactosidase, com a expressão controlada pelo promotor do gene *nifH* de *K. pneumoniae*, ativado pela NifA de *H. seropedicae*. Dessa forma, quando a proteína NifA é expressa e está ativa, a enzima β -galactosidase é sintetizada a partir da fusão *nifH::lacZ*. Como a estirpe não possui atividade de β -galactosidase, toda a atividade observada dessa enzima reflete a atividade da proteína NifA expressa no sistema.

Como controles negativos do experimento foi utilizada a estirpe JM109 (DE3) transformada apenas com o plasmídeo pRT22 e com os plasmídeos pRT22 e pET28a sem inserto. O controle positivo do experimento foi a estirpe JM109 (DE3) transformada com os plasmídeos pRT22 e pRAM2. Os resultados são apresentados na figura 14.

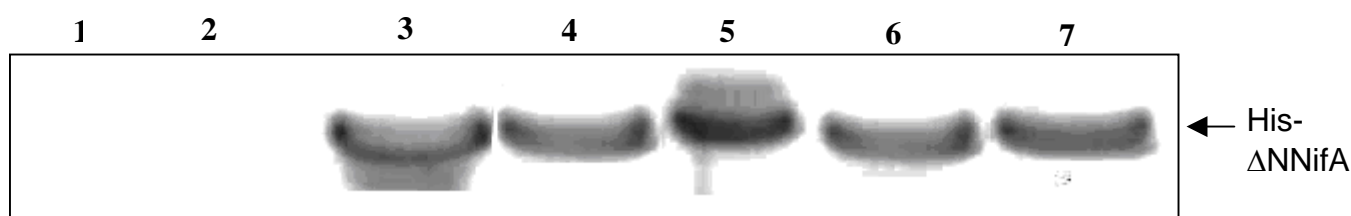
Figura 14 – Ativação da transcrição *in vivo* pelas proteínas mutantes



As células JM109 (DE3) contendo o plasmídeo pRT22 foram transformados com diversos plasmídeos e o ensaio de β -galactosidase foi realizado como descrito em Materiais e Métodos. O ensaio foi realizado na ausência (azul) ou presença (vermelho) de oxigênio. O gráfico apresenta a atividade de β -galactosidase da estirpe JM109pRT22 sem nenhum outro plasmídeo, transformada com o plasmídeo pET28a, transformada com o plasmídeo pRAM2, expressando a proteína NifA N-truncada selvagem de *H. seropedicae* e transformada com os plasmídeos pMAO1, pMAO2 e pMAO3 e pMAO4, expressando as proteínas mutantes. Os dados correspondem a média de 3 experimentos independentes.

Para verificar se no experimento de ativação da transcrição as proteínas mutantes estavam sendo expressas, e se o nível de expressão era semelhante à do controle positivo, as culturas usadas para esses experimentos foram submetidas a “western blot”, de acordo com o item 3.10. A figura 15 mostra o resultado do experimento, realizado com o anticorpo anti-His, que reconhece a proteína porque ela foi expressa fusionada a uma cauda His. Esse experimento também foi realizado com o anticorpo anti-NifA, gerando resultados semelhantes (dados não mostrados).

Figura 15 – Ensaio de “Western blot” das culturas expressando a proteína NifA



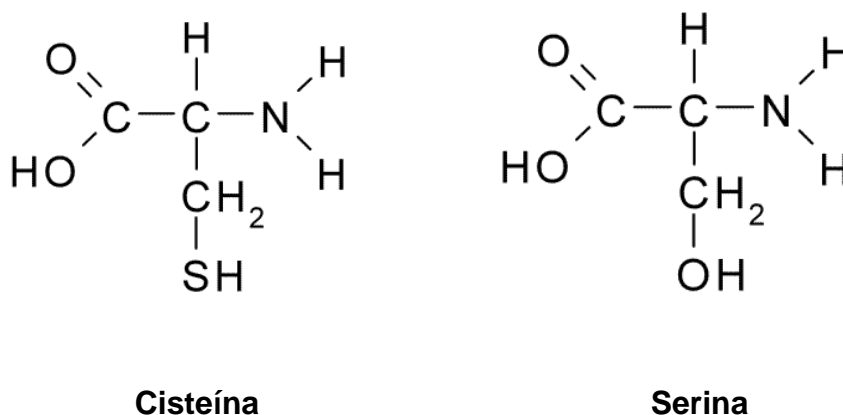
Extratos celulares da bactéria JM109 (DE3) (linha 1), contendo o pET28a (linha 2), pRAM2 (linha 3), pMAO1 (linha 4), pMAO2 (linha 5) e pMAO3 (linha 6) e pMAO 4 (linha 7) foram cultivados em anaerobiose por 8 horas a 30°C. Os ensaios de expressão *in vivo* foram conduzidos em meio NFDM. Foi utilizado o anticorpo anti-His. As proteínas foram expressas a partir do promotor T7 após a indução com IPTG. A detecção das proteínas foi feita através da reação da peroxidase por quimioluminescência a partir do conjugado anti-IgG-peroxidase. A seta mostra a banda na proteína NifA N-truncada.

O resultado do Western blot permite concluir que as proteínas mutantes estavam sendo expressas de forma semelhante ao controle positivo que apresentou atividade. Portanto, a ausência de atividade encontrada no teste de ativação de transcrição pode mesmo ser atribuído à mutação.

A ausência de atividade das proteínas mutantes no ensaio de ativação da transcrição sugere que o sítio conservado de cisteínas contido no domínio central e região interdomínios da proteína NifA de *H. seropedicae* é essencial

para a sua atividade. É bastante provável que a mudança de uma cisteína para uma serina tenha sido uma modificação química muito sutil, sem alteração nas forças intramoleculares da proteína, tendo em vista que os dois aminoácidos são bastante semelhantes (Figura 16). No entanto, caso essas cisteínas estejam de fato participando de um cluster 4Fe-4S, a substituição das cisteínas por serinas ocasionaria a perda da capacidade da proteína formar esse cluster.

Figura 16 – Estrutura dos aminoácidos cisteína e serina.



A figura mostra uma representação da estrutura molecular dos aminoácidos cisteína e serina. A diferença entre os dois é a presença de enxofre (cisteína) ou oxigênio (serina) do grupo substituinte.

Resultados semelhantes também foram encontrados para a proteína NifA de *B. japonicum*. Nessa proteína, a deleção da região contendo as 4 cisteínas conservadas leva a uma perda da atividade (Fischer et al, 1988). Posteriormente também foi mostrado que o espaçamento entre essas cisteínas é importante para a atividade da proteína (Fischer et al, 1989). Esses dados corroboram a idéia da existência de um cluster metálico na proteína.

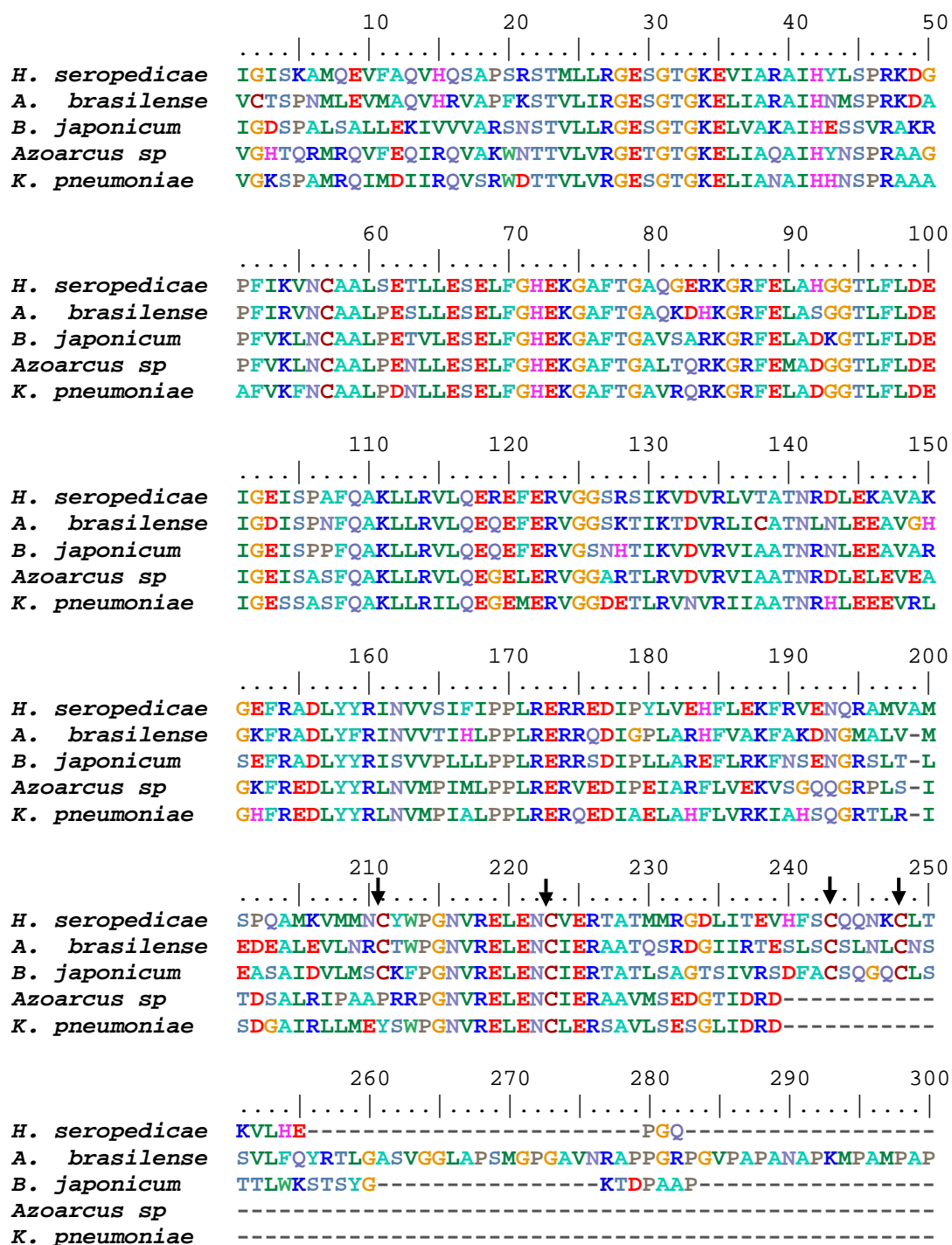
Muitas proteínas que contêm cluster Fe-S, que possuem função regulatória têm sido descritas recentemente. A vulnerabilidade à destruição oxidativa dessas estruturas garante uma alta eficiência na sensibilidade ao oxigênio,

permitindo que regulem vias metabólicas em resposta a esse sinal ambiental (Imlay, 2006).

A oxidação de clusters Fe-S tem duas conseqüências possíveis: a primeira é um rearranjo ou completa destruição do cluster, o que geralmente é irreversível ou requer enzimas para reversão (categoria 1) (Beinert e Kiley, 1999). A segunda conseqüência é uma oxidação por um elétron, que é rapidamente reversível, dependendo no nível redox ou da presença de agentes oxidantes no ambiente (categoria 2) (Beinert e Kiley, 1999). Os efeitos da oxidação resultante de influências ambientais (e sua eventual reversão) são comunicados para as outras regiões da proteína para que o efeito regulatório possa ser expresso. É possível que o provável cluster presente na proteína NifA de *H. seropedicae* pertença à categoria 1. Esse fato explicaria o resultado obtido por Monteiro e colaboradores (2003a), no qual a proteína NifA N-truncada foi inativa em estirpes de *E. coli* mutantes no gene *fnr*. Esse gene codifica a proteína Fnr, uma reguladora de transcrição responsável por ativar ou reprimir a transcrição de genes em condições de anaerobiose. Dessa forma, para que o cluster da proteína NifA seja formado ou organizado, talvez seja necessária a presença de uma enzima que auxilie no processo. Em estirpes *fnr* mutantes, essa proteína estaria ausente, levando a uma perda de atividade da proteína NifA, possivelmente devido a sua proteólise (Monteiro et al, 2003a).

É importante notar que esse motivo conservado de cisteínas não é conservado nas bactérias que possuem a proteína NifL. A figura 17 mostra um alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína NifA de *H. seropedicae* com a seqüência da proteína NifA de *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azoarcus sp* BH72 e *Klebsiella pneumoniae*.

Figura 17 – Alinhamento da sequência de aminoácidos dos domínios central+C-terminal da proteína NifA de organismos de diferentes classes das Proteobactérias



	310	320	330	340	350
<i>H. seropedicae</i>	-----	QQPVVVVPLE	ERISAP	--YGAI
<i>A. brasilense</i>	VP	EPVGAGGGAWP	CASGCSAGPSPV	CGAAQPVVPVPLIPLPLPE	PSAPA
<i>B. japonicum</i>	-----	-----	MQPVP	AKSIIP	LAETAPPPQA
<i>Azoarcus sp</i>	-----	-----	-----	LILISG	IEERVTP
<i>K. pneumoniae</i>	-----	-----	-----	VILFNHRD	NPPKA
	360	370	380	390	400
<i>H. seropedicae</i>	FAEWDGQGGATGAAPTSE	-----	RERLIWAMEQC	GWVQAKAAR
<i>A. brasilense</i>	AAAPPAASVANAAPPPAAE	EVPLDEPESGSLRD	RLWAMERTGWVQAKAAR		
<i>B. japonicum</i>	VCEPGSLAPSGTVLVSGARMAD	-----	REVVAAAMEKSGWVQAKAAR		
<i>Azoarcus sp</i>	LRGGGGTVD--LDDPGLDE	-----	REVVAAALEQAGWVQAKAAR		
<i>K. pneumoniae</i>	LASSGPAEDGWLDN-SLDE	-----	RQRLIAALEKAGWVQAKAAR		
	410	420			
<i>H. seropedicae</i>	ALNISPQMGYALQKFNI	EVKKF		
<i>A. brasilense</i>	LLGMTTRQVSYALRKYNIEIKRF				
<i>B. japonicum</i>	LLGLTPRQVGYALRKYGIEIKRF				
<i>Azoarcus sp</i>	LLGMTPRQIAYRIQTLNIKVRQI				
<i>K. pneumoniae</i>	LLGMTPRQVAYRIQIMDITMPRL				

As seqüências de aminoácidos dos domínios central e C-terminal das proteínas NifA de *H. seropedicae*, *A. brasilense*, *B. japonicum*, *Azoarcus sp* BH72 e *K. pneumoniae* foram alinhadas usando o programa clustalW. As cisteínas conservadas que foram mutagenizadas, localizadas nesse alinhamento nas posições 211, 223, 243 e 248 estão marcadas com uma seta. *Herbaspirillum seropedicae*, *A. brasilense* e *B. japonicum* não possuem proteína NifL, enquanto que *Azoarcus sp* BH72 e *K. pneumoniae* possuem.

As γ -proteobactérias, representada nesse alinhamento pela bactéria *K. pneumoniae*, possuem a proteína NifL, que inibe a proteína NifA em resposta aos níveis de oxigênio e amônio. Nessas bactérias, o motivo conservado de cisteínas está ausente, como pode ser visualizado pelo alinhamento. Nas α -proteobactérias, representadas nesse alinhamento por *B. japonicum* e *A. brasilense*, não existe nenhuma evidência da existência de um anti-ativador e, provavelmente, a própria proteína NifA é responsável por inibir sua atividade em resposta ao oxigênio. Nessas bactérias o motivo conservado de cisteínas está presente. *Azoarcus sp* BH72 e *H. seropedicae* são os representantes das β -proteobactérias no alinhamento. No entanto, ao contrário de *H. seropedicae*,

Azoarcus sp possui uma proteína NifL, que inibe a proteína NifA em resposta às concentrações de oxigênio (Egener et al, 2002). De fato, a análise do alinhamento permite observar que a NifA de *Azoarcus sp* BH72 não possui o motivo conservado de cisteínas. Egener e colaboradores (2002) sugerem que para diazotrofos da classe β o padrão de regulação seja semelhante ao encontrado nas γ -proteobactérias, e que *H. seropedicae* poderia ter adquirido o cluster de genes *nif* das α -proteobactérias por transferência lateral. A ausência do motivo conservado de cisteínas em *Azoarcus sp* BH72, filogeneticamente próxima à *H. seropedicae*, reforça ainda mais a hipótese de que esse motivo esteja relacionado com a sensibilidade ao oxigênio.

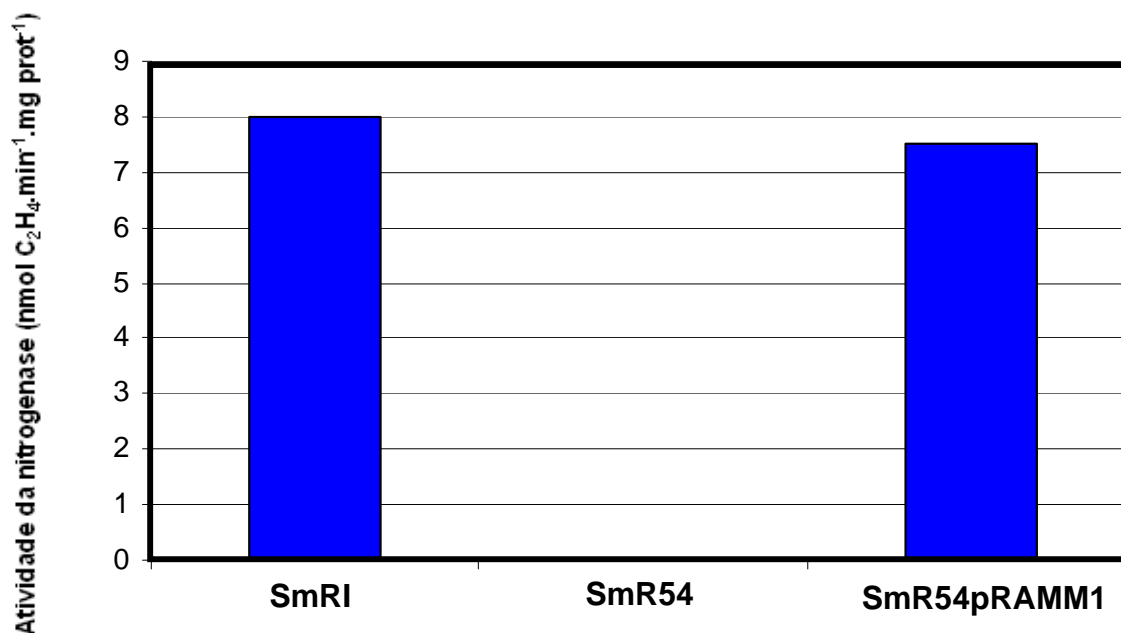
4.5 Complementação da estirpe mutante SmR54 de *H. seropedicae*

Para verificar a atividade das proteínas mutantes em *H. seropedicae* seria importante inicialmente verificar se a proteína NifA, fusionada à cauda His, expressa a partir do promotor *lac*, é capaz de ativar a transcrição dos genes *nif*. Para isso, a proteína NifA de *H. seropedicae* foi expressa dessa forma na estirpe Smr54 de *H. seropedicae*.

A estirpe SmR54 de *H. seropedicae* é mutante no gene *nifA*. Para realizar o ensaio de complementação dessa estirpe, o plasmídeo pRAM1, que possui o gene *nifA* de *H. seropedicae* clonado no vetor pET28a foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III, liberando um fragmento contendo o gene clonado. Esse fragmento foi então ligado ao vetor pLAFR3.18, que é estável em *H. seropedicae*, cortado com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante, contendo o gene *nifA* clonado em pLAFR3.18 foi chamado de pRAMM1. Nessa construção, a proteína NifA é expressa com cauda His.

O plasmídeo pRAMM1 foi transformado na estirpe SmR54 e a atividade de nitrogenase foi avaliada de acordo com o item 3.7. O resultado é apresentado no gráfico contido na figura 18.

Figura 18 – Atividade da nitrogenase da estirpe SmR54 complementada



O plasmídeo foi transformado na estirpe SmR54 de *H. seropedicae* e o ensaio da nitrogenase foi realizado como descrito em Materiais e Métodos. O gráfico contém a atividade de nitrogenase da estirpe SmRI, da estirpe SmR54 e da estirpe SmR54 transformada com o plasmídeo pRAMM1. Os dados correspondem a média de 3 experimentos independentes.

O resultado do experimento da nitrogenase permite concluir que a proteína de fusão NifA His-tag expressa a partir do plasmídeo pRAMM1 é capaz de restaurar completamente o fenótipo de fixação de nitrogênio da estirpe SmR54 de *H. seropedicae*. Posteriormente, as mutações realizadas nesse trabalho serão inseridas no gene que codifica a proteína NifA inteira, o mesmo ensaio será realizado com as proteínas mutantes.

4.6 Análise estrutural *in silico* da proteína NifA de *H. seropedicae*

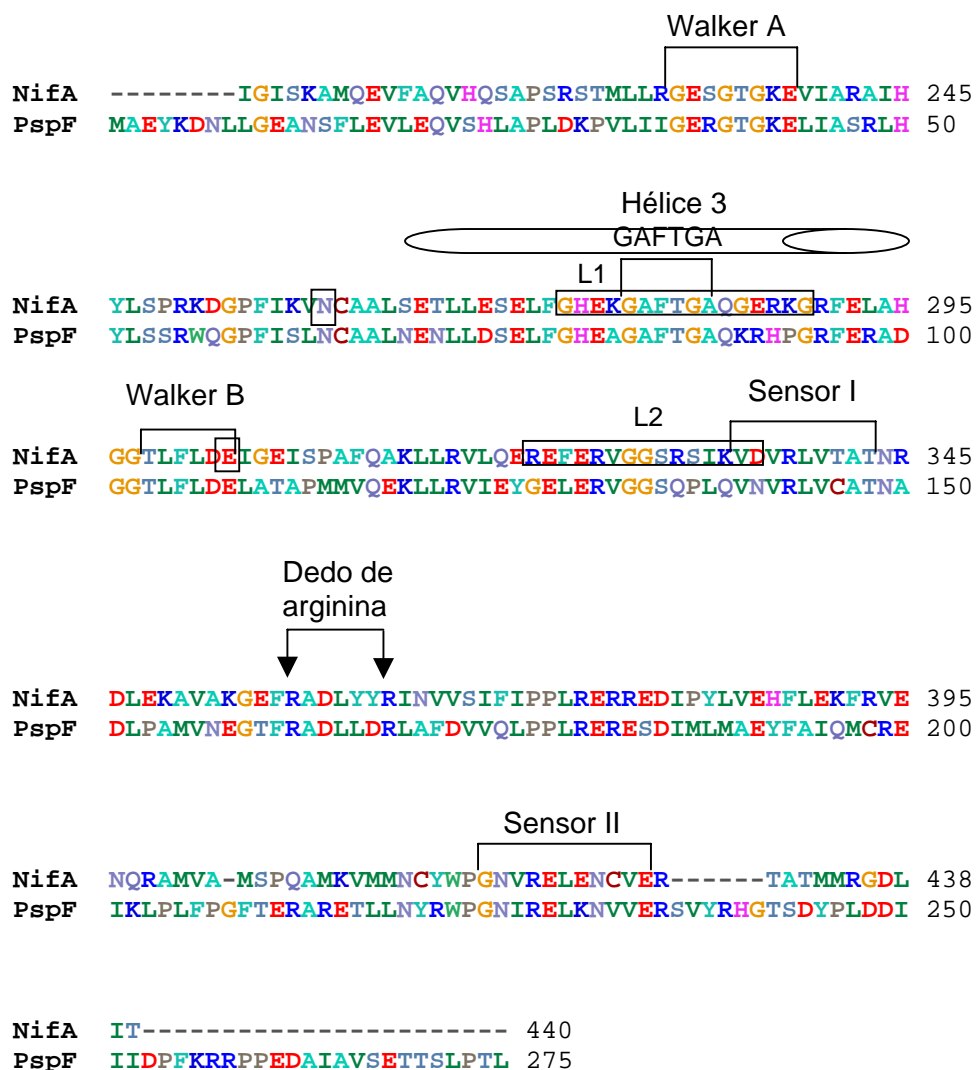
Recentemente, vários trabalhos têm mostrado a estrutura tridimensional de proteínas da família AAA+. Baseando-se nessas estruturas já descritas, a estrutura da proteína NifA de *H. seropedicae* foi estudada *in silico*. Devido à grande insolubilidade dessa proteína, sua caracterização estrutural *in vitro* é

bastante difícil. Por isso, o estudo *in silico* pode ser uma importante ferramenta para relacionar a estrutura da proteína com sua função.

4.6.1 Identificação de determinantes estruturais na proteína NifA de *H. seropedicae* por alinhamento

O mecanismo molecular envolvido na ativação da transcrição tem sido descrita com riqueza de detalhes, utilizando principalmente, a proteína PspF de *E. coli* como modelo (Bordes et al, 2004; Cannon et al, 2000; Cannon et al, 2003; Cannon et al, 2004; Chaney, 2001; Rappas et al, 2005; Rappas et al, 2006a; Joly et al, 2006; Schumacher et al, 2004; Schumacher et al, 2006). Esses estudos têm identificado determinantes moleculares importantes no processo de ligação e hidrólise do nucleotídeo, transdução de estado de hidrólise do nucleotídeo e contato com a RNA polimerase σ^{54} . Para identificar esses determinantes estruturais na sequência de aminoácidos da proteína NifA de *H. seropedicae*, o domínio central da proteína NifA foi alinhado com o domínio AAA+ da proteína PspF (Figura 19).

Figura 19 – Alinhamento dos domínios AAA da proteína NifA de *H. seropedicae* e PspF de *E. coli*



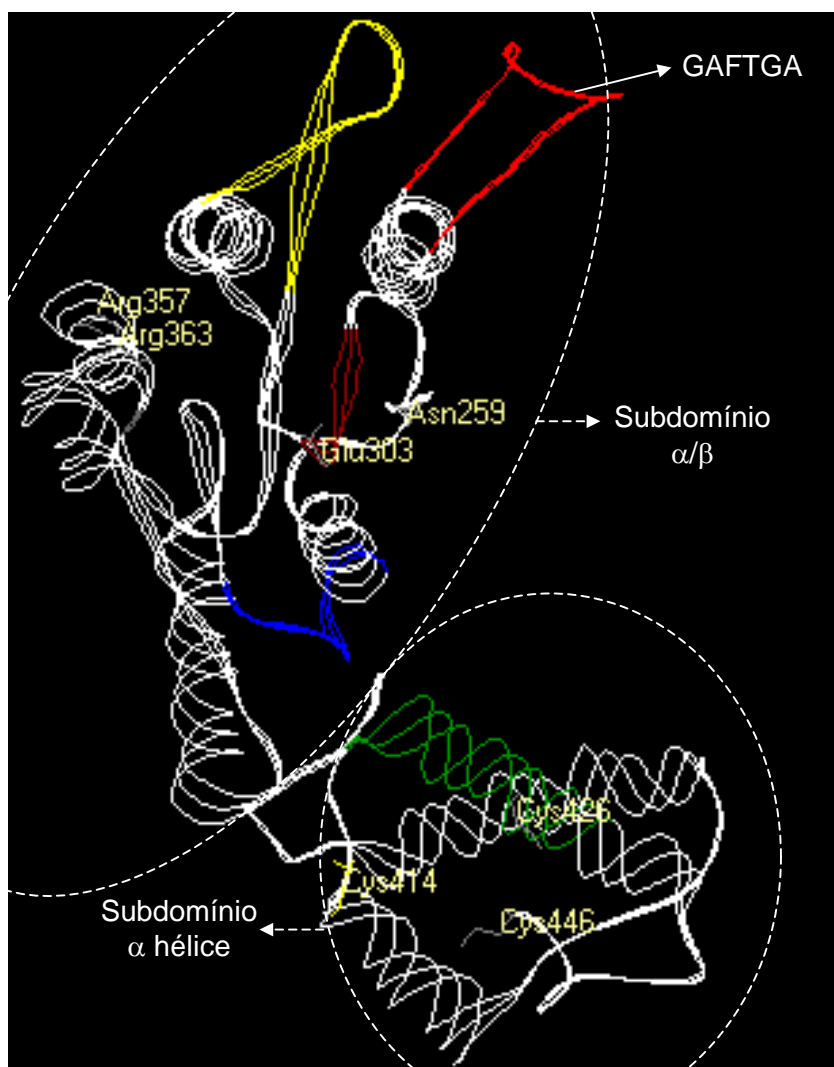
Alinhamento da sequência de aminoácidos dos domínios AAA das proteínas NifA de *H. seropedicae* e PspF de *E. coli*. Alguns dos determinantes estruturais já descritos para outras proteínas foram indentificados em *H. seropedicae* e destacados no alinhamento. São mostrados os motivo Walker A e Walker B, os sensores I e II, o motivo GAFTGA contido na hélice 3, o dedo de arginina, as alças de L1 e L2 e o par de aminoácidos sensores Glu303 e Asp259.

A análise do alinhamento permite observar que os determinantes estruturais cuja importância já foi bem descrita para outras proteínas da mesma família são bastante conservados na proteína NifA de *H. seropedicae*. Esse fato indica que o mecanismo molecular descrito para essas proteínas deve ser semelhante ao mecanismo de funcionamento da proteína NifA. Foi possível identificar os motivos de ligação e hidrólise de ATP Walker A e Walker B, os sensores do estado de hidrólise de ATP 1 e 2, o dedo de arginina, o motivo GAFTGA dentro da hélice 3 e o par de aminoácidos Glu303 e Asp259 (correspondentes aos aminoácidos Glu108 e Asp64 da proteína PspF), responsáveis pela transdução do sinal da hidrólise do ATP para o motivo GAFTGA (Rappas et al, 2006a). Esses determinantes podem ser importantes para futuros trabalhos com a proteína NifA com o objetivo de descrever o mecanismo molecular da ativação da transcrição dos genes *nif*.

4.6.2 Predição da estrutura terciária da proteína NifA de *H. seropedicae*

Para fazer a predição da estrutura terciária da proteína NifA de *H. seropedicae* foi utilizado o programa “Swiss-model”, disponibilizado na internet. Esse programa modela uma sequência de aminoácidos baseado na similaridade da sequência com sequências de proteínas cuja estrutura já foi resolvida. A comparação é feita contra as sequências de aminoácidos das proteínas contidas no banco de dados do servidor (BLASTP contra o “protein data banking”). Baseado na estrutura tridimensional das proteínas com alta similaridade, o programa gera coordenadas tridimensionais para cada átomo da proteína com estrutura desconhecida, procurando posicioná-los nas coordenadas com menor energia. Essas coordenadas dão origem a um arquivo com um modelo para a estrutura tridimensional da proteína submetida. O modelo gerado foi visualizado e editado com auxílio do programa “DeepView – Swiss-PdbViewer”, e está mostrado na figura 20.

Figura 20 – Predição da estrutura tridimensional do domínio central da proteína NifA de *H. seropedicae*



Os motivos estruturais identificados no item 4.6.1 são mostrados. Em amarelo é mostrada a alça L2 e em vermelho a alça L1, contendo o motivo GAFTGA de contato com a subunidade σ^{54} no ápice. Os dois sub-domínios, α -hélice e α/β podem ser visualizados. Em azul é mostrado o motivo Walker A e em marrom motivo Walker B. Em verde é mostrado o sensor 2. Os aminoácidos Arg357 e Arg363, formadores do dedo de Arginina, e Glu303 e Asn259, sensores do estado de hidrólise do ATP também são mostrados. No subdomínio α -hélice são mostradas as 3 cisteínas do motivo conservado contidas no domínio central (Cys414, Cys426 e Cys446).

O modelo obtido é bastante semelhante ao encontrado para outras proteínas da família AAA+, principalmente dos ativadores de transcrição (Figura 1). Foi possível distinguir no modelo os dois sub-domínios (α hélice e α/β), contendo os principais determinantes estruturais já descritos em outras proteínas. As alças L1 e L2, que fazem contato com a subunidade σ^{54} , possuem estrutura semelhante à encontrada para os ativadores de transcrição ligados a ADP (Rappas et al, 2006b). Na superfície da alça L1, encontra-se o motivo GAFTGA, que já teve sua importância no contato com a subunidade σ^{54} mostrada por estudos bioquímicos e estruturais (Chaney et al, 2001; Bordes et al, 2004; Gallegos et al, 1999; Rappas et al, 2005). O par de aminoácidos Glu303 e Asn259, responsáveis por transmitir o sinal de hidrólise do nucleotídeo para as alças de contato com a subunidade σ^{54} , encontram-se relativamente próximos entre si e relacionados com o motivo de hidrólise do nucleotídeo e as alças de contato com a subunidade σ^{54} . Os aminoácidos Arg357 e Arg363, formadores do “dedo de arginina”, envolvido nas mudanças conformacionais em resposta a hidrólise de nucleotídeo, encontram-se próximo da alça L2.

As cisteínas contidas no domínio central mutagenizadas nesse trabalho, Cys414, Cys426 e Cys446, foram também mostradas no modelo. Foi possível observar que essas cisteínas parecem estar próximas e organizadas, corroborando com a idéia de que elas podem coordenar um átomo metálico na estrutura.

A análise do modelo permitiu observar que parece existir uma homologia bastante grande na estrutura do domínio central da proteína NifA de *H. seropedicae* com as proteínas ativadoras de transcrição já descritas. Essa alta homologia estrutural provavelmente corresponde a uma homologia funcional. Dessa forma, grande parte dos avanços no conhecimento sobre funcionamento de outros ativadores de transcrição pode ser extrapolada para a proteína NifA de *H. seropedicae*.

5. Conclusões

- As cisteínas 414, 426, 446 e 451 são essenciais para a atividade da proteína NifA de *H. seropedicae*, fortalecendo a hipótese de que essas cisteínas regulam a atividade da proteína em resposta aos níveis de oxigênio pode ser verdadeira.
- O fenótipo de fixação de nitrogênio da estirpe SmR54 (*nifA*⁻) de *H. seropedicae* pode ser restaurado com a expressão da proteína NifA fusionada a cauda His, expressa a partir do promotor *lac*.
- O modelo estrutural do domínio central da proteína NifA de *H. seropedicae* construído *in silico* é bastante semelhante ao encontrado para outros domínios AAA+, podendo ser encontrados conservados todos os motivos estruturais já identificados nas proteínas com estrutura tridimensional já resolvida.

6. Referências bibliográficas

ADLER, S.P.; PURICH, D.; STADTMAN, E.R. Cascade Control of the *Escherichia coli* Glutamine Synthetase. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6264-6272, 1975.

ARAUJO, L.M.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 491-495, 2004.

AUSTIN, S.; BUCK, M.; CANNON, W.; EYDMANN, T.; DIXON, R. Purification and In Vitro Activities of the Nitrogen Fixation Control Proteins NifA and NifL. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 3460-3465, 1994.

ARCONDEGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80-105, 2001.

ARSENE, F.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA Activity by PII in *Azospirillum brasilense*: Evidence by a Regulatory Role of the NifA N-terminal Domain. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4830-4838, 1996.

ARSENE, F.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by PII: effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 339-343, 1999.

BABST, M.; WENDLAND, B.; ESTEPA, E.J.; EMR, S.D. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. **EMBO J.**, v. 17, p. 2982-2993, 1998.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 56, p.365, 1984.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* com. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BALI, A.; BLANCO, G.; HILL, S.; KENNEDY, C. Excretion of Ammonium by a *nifL* Mutant of *Azotobacter vinelandii* Fixing Nitrogen. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 1711-1718, 1992.

BEINERT, H.; KILEY, P.J. Fe-S proteins in sensing regulatory functions. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 3, p. 152-157, 1999.

BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Evidence for Two Possible *glnB*-Type Genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; LEE, H.; KUSTU, S. In Vitro Studies of the Domains of the Nitrogen Fixation Regulatory NifA Protein. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 191-199, 1995.

BONDAREKO, V.; LIU, Y.; NINFA, A.; STUDITSKY, M. Action of prokaryotic enhancer over a distance does not require continued presence of promoter-bound σ^{54} subunit. **Nucl. Acids Res.**, v. 30, p. 636-642, 2002.

BORDES, P.; WIGNESHWARARAJ, S.R.; CHANEY, M.; DAGO, A.E.; MORETT, E.; BUCK, M. Communication between $E\sigma^{54}$, promoter DNA and the conserved threonine residue in the GAFTGA motif of the PspF σ^{54} -dependent activator during transcription activation. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 489-506, 2004.

BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCK, M.; GALLEGOS, M.; STUDHOLME, D.J.; GUO, Y.; GRALLA, J.D. The Bacterial Enhancer-Dependent σ^{54} (σ^N) Transcription Factor. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 4129-4136, 2000.

BUCK, M.; BOSE, D.; BURROWS, P.; CANNON, W.; JOLY, N.; PAPE, T.; RAPPAS, M.; SCHUMACHER, J.; WIGNESHWERARAJ, S.; ZHANG, X. A second paradigm for gene activation in bacteria. **Biochem. Soc.**, v. 34, p. 1067-1071, 2006.

BULEN, W.A.; LECOMTE, J.R. The Nitrogenase System of *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N_2 reduction, ATP-dependent H_2 evolution and ATP-hydrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 56, p. 979-986, 1966.

BURGESS, B.K.; LOWE, D.J. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 2983-3011, 1996.

CANNON, F.C.; DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Chromosomal integration of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes in *E. coli*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 80, p. 227-239, 1974.

CANNON, W.V.; KREUTZER, R.; KENT, H.M.; MORETT, E.; BUCK, M. Activation of the *Klebsiella pneumoniae nifU* promoter: identification of multiple and overlapping upstream NifA binding sites. **Nucl. Acids Res.**, v. 18, p. 1693-1701, 1990.

CANNON, W.V.; GALLEGOS, M.; BUCK, M. Isomerization of binary sigma-promoter DNA complex by transcriptional activators. **Nat. Struct. Biol.**, v. 7, p. 594-601, 2000.

CANNON, W.; BORDES, P.; WIGNSHWERARAJ, S.R.; BUCK, M. Nucleotide-dependent Triggering of RNA Polymerase-DNA Interactions by an AAA Regulator of Transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 19815-19825, 2003.

CANNON, W.V.; SCHUMACHER, J.; BUCK, M. Nucleotide-dependent interactions between a fork junction-RNA polymerase complex and a AAA+ transcriptional activator protein. **Nucl. Acid. Res.**, v. 32, p. 4596-4608, 2004.

CARMONA, M.; MAGASANIK, B. Activation of Transcription at σ^{54} -dependent Promoters on Linear Templates Requires Intrinsic or Induced Bending of the DNA. **J. Mol. Biol.**, v. 261, p. 348-356, 1996.

CARMONA, M.; CLAVERIE-MARTIN, F.; MAGASANIK, B. DNA bending and the initiation of transcription at σ^{54} -dependent bacterial promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 9568-9572, 1997.

CHANEY, M.; GRANDE, R.; WIGNESHWERARAJ, S.R.; CANNON, W.; CASAZ, P.; GALLEGOS, M.; SCHUMACHER, J.; JONES, S.; ELDERNKIN, S.; DAGO, A.E.; MORETT, E.; BUCK, M. Binding of transcriptional activators to sigma 54 in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action. **Genes Dev.**, v. 15, p. 2282-2294, 2001.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; LI, J. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr→Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Mol. Gen. Genomics**, v. 273, p. 415-422, 2005.

COLNAGHI, R.; RUDNICK, P.; HE, L.; GREEN, A.; YAN, D.; LARSON, E.; KENNEDY, C. Lethality of *glnD* null mutations in *Azotobacter vinelandii* is suppressible by prevention of glutamine synthetase adenylation. **Microbiology**, v. 147, p. 1267-1276, 2001.

CONROY, M.J.; DURAND, A.; LUPO, D.; LI, X.D.; BULLOUGH, P.A.; WINKLER, F.K.; MERRICK, M. The crystal structure of the Escherichia coli AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, p. 1213-1218, 2007.

CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M.; BALI, A.; BLANCO, G.; GARCIA, A.; BUSH, G.; KENNEDY, C.; MERRICK, M. The Product of Nitrogen Fixation Regulatory Gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* Is Functionally and Structurally Homologous to the Uridylyltransferase Encoded by *glnD* in Enteric Bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 7741-7749, 1991.

CORBETT, M.C.; HU, Y.; NADERI, F.; RIBBE, M.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. Comparison of Iron-Molybdenum Cofactor-deficient Nitrogenase MoFe proteins by X-ray Absorption Spectroscopy. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 28276-28282, 2004.

COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.**, v. 21, p. 536-545, 2002.

CRISTIANSEN, J.; DEAN, D.R.; SEEFELDT. Mechanistic Features of the Mo-Containing Nitrogenase. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 269-295, 2001.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, A.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67. p. 2375 – 2379, 2001.

D'AUTRÉAUX, B.; TUCKER, N.P.; DIXON, R.; SPIRO, S. A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. **Nature**, v. 437, p. 769-772, 2005.

DALAL, S.; ROSSER, M.F.N.; CYR, D.N.; HANSON, P. Distinct roles for the AAA ATPases NSF and p97 in the Secretory Pathway. **Mol. Biol. Cell**, v. 15, p. 637-648, 2004.

DE CARLO, S.; CHEN, B.; HOOVER, T.R.; KONDRASHKINA, E.; NOGALES, E.; NIXON, T. The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC. **Genes Dev.**, v. 20, p. 1485-1495, 2006.

DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 127, p. 285-294, 1966.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.

DIXON, R. The oxygen-responsive NifL-NifA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in γ -Proteobacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 169, p. 371-380, 1998.

DOMMELEN, A.V.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 2652-2659, 1998.

DOS SANTOS, P.C.; DEAN, D.R.; HU, Y.; RIBBE, M.W. Formation and Insertion of Nitrogenase Iron-Molybdenum Cofactor. **Chem. Rev.**, v. 104, p. 1159-1173, 2004.

DREPPER, T.; GROSS, S.; YAKUNIN, A.F.; HALLENBECK, P.C.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, v. 149, p. 2203-2212, 2003.

DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. **EMBO J.**, v. 5, p. 441-447, 1986.

EGENER, T.; SARKAR, A.; MARTIN, D.E.; REINOLD-HUREK, B. Identification of a NifL-like protein in the diazotroph of the β -subgroup of the Proteobacteria, *Azoarcus* sp. strain BH72, **Microbiol.**, v. 148, p. 3203-3212, 2002.

EYDMANN, T.; SODERBACK, E.; JONES, T.; HILL, S.; AUSTIN, S.; DIXON, R. Transcriptional Activation of the Nitrogenase promoter In Vitro: Adenosine Nucleotides Are Required for Inhibition of NIFA Activity by NIFL. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 1186-1195, 1995.

FENTON, M.S.; LEE, S.J.; GRALLA, J.D. *Escherichia coli* promoter opening and -10 recognition: mutational analysis of σ^{70} . **EMBO J.**, 19, p. 1130-1137, 2000.

FIELDS, S. Global nitrogen: Cycling out of Control. **Environ. Health Perspect.** v. 112, p. A-556-A563, 2004.

FISCHER, H.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 2207-2224, 1988.

FISCHER, H.; FRITSCH, S.; HERZOG, B.; HENNECK, H. Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein. **FEBS Lett.**, v. 225, p. 167-171, 1989.

FISCHER, H. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 152-386, 1994.

GALLEGOS, M.T.; CANNON, W.V.; BUCK, M. Functions of the σ^{54} Region I in *Trans* and Implications for Transcription Activation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 25285-25290, 1999.

GRABBE, R.; KLOPPROGGE, K.; SCHMITZ, R.A. Fnr Is Required for NifL-Dependent Oxygen Control of *nif* Gene Expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 1385-1393, 2001.

GRABBE, R.; SCHMITZ, R.A. Oxygen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae* depends of NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 1555-1566, 2003.

GRUSWITZ, F.; O'CONNELL, 3rd; STROUD, R.M.; Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, p. 42-47, 2007.

GUO, Y.; GRALLA, J.D. Promoter opening via a DNA fork junction binding activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 11655-11660, 1998.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M.; LADHA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytol.**, v. 154, p. 131-145, 2002.

HAGEMAN, R.V.; BURRIS, R.H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, p. 2699-2702, 1978.

HANSON, P.I.; WHITEHEART, S.W. AAA+ Proteins: Have Engine, Will Work. **Mol. Cel. Bio.**, v. 6, p. 519-529, 2005.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological Role for the GlnK Protein of Enteric Bacteria: Relief of NifL Inhibition under Nitrogen-Limiting conditions. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 6661-6667, 1998.

HELLING, L.B. Why Does *Escherichia coli* Have Two Primary Pathways for Synthesis of Glutamate? **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4664-4668, 1994.

HELLING, L.B. Pathway Choice in Glutamate Synthesis in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 4571-4575, 1998.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 2143-2148, 1996.

HIRSCHMAN, J.; WONG, P.; SEI, K.; KEENER, J.; KUSTU, S. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA*

transcription *in vitro*: Evidence that the *ntrA* product is a σ factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 7525-7529, 1985.

HUALA, E.; AUSUBEL, F.M. The Central Domain of the *Rhizobium meliloti* NifA Is Sufficient To Activate Transcription from the *R. meliloti nifH* promoter. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3354-3365, 1989.

HUALA, E.; STIGTER, J.; AUSUBEL, F.M. The Central Domain of the *Rhizobium leguminosarum* DctD functions Independently To Activate Transcription. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 1428-1431, 1992.

HUERGO, L.F.; SOUZA, E.M.; ARAUJO, M.S.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; STEFFENS, M.B.R; MERRICK, M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. **Mol. Microbiol.**, v, 59 (1), p. 326-337, 2006.

HUNT, T.P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by a purified *Escherichia coli* components: Core RNA polymerase and the products *glnF*, *glnG* and *glnL*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 8453-8457, 1985.

IMLAY, J.A. Iron-sulphur clusters and the problem with the oxygen. **Mol. Microbiol.**, v. 59, p. 1073-1082, 2006.

JACK, R.; ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The Signal Transduction Protein GlnK Is Required for NifL-dependent Nitrogen Control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1156-1162, 1999.

JANG, S.B.; SEEFELDET, L.C.; PETERS, J.W. Modulating the Midpoint Potential of the [4Fe-4S] Cluster of the Nitrogenase Fe Protein. **Biochemistry**, v. 39, p. 641-648, 2000.

JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem**, v. 279, p. 8530-8538, 2004.

JAYAKUMAR, A.; HWANG, S.J.; FABINY, J.M.; CHINAULT, A.G.; BARNES, E.M. Isolation of an Ammonium or Methylammonium Ion Transport Mutant of *Escherichia coli* and the Complementation by the Cloned Gene. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 996-1001, 1989.

JOLY, N.; SCHUMACHER, J.; BUCK, M. Heterogeneous Nucleotide Occupancy Stimulates Functionality of PspF, an AAA+ Transcriptional Activator. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 34997-35007, 2006.

KAMBEROV, E.S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, A.J. The *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Is Activated upon Binding 2-Ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 17797-17807, 1995.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 43, p. 887-891, 1997.

KLEINER, D.; PAUL, W.; MERRICK, M.J. Construction of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 1779-1784, 1988.

KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R.; HOPPERT, M.; SCHMITZ, R.A. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Arch. Microbiol.**, v. 177, p. 223-234, 2002.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of σ^{54} (*ntrA*)-Dependent Genes Is Probably United by a Common Mechanism. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 367-376, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LEE, H.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. In Vitro Activity of NifL, a Signal Transduction Protein for Biological Nitrogen Fixation. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7683-7688, 1993.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct Interaction of the NifL Regulatory Protein with the GlnK Signal Transduction Enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA Regulatory System to Respond to Conditions Replete for Nitrogen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 15472-15481, 2002.

LONETTO, M.; GRIBSKOV, M.; GROSS, C.A. The σ^{70} Family: Sequence Conservation and Evolutionary Relationships. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 3843-3849, 1992.

LUPAS, A.N.; MARTIN, J. AAA proteins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, p. 746-753, 2002.

MACHEROUX, P.; HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; KIM, S.; POOLE, R.; DIXON, R. Electron donate to the flavoprotein NifL, a redox sensing transcriptional regulator. **Biochem. J.**, v. 332, p. 413-419, 1998.

MARINI, A.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; ANDRÉ, B. Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding an ammonium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v. 13, p. 3456-3463, 1994.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R. The NifL-NifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 601-610, 2004a.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein NifL. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p. 1731-1744, 2004b.

MAYER, S.M.; LAWSON, D.M.; GORMAL, C.A.; ROE, S.M.; SMITH, B.E. New Insights into Structure-function Relationships in Nitrogenase: A 1,6 Å Resolution X-ray Crystallographic study of *Klebsiella pneumoniae* MoFe protein. **J. Mol. Biol.**, v. 292, p. 871-891, 1999.

MELETZUS, D.; RUDNICK, P.; DOETSCH, N.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-amtB* Operon of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 3260-3264, 1998.

MERRICK, M.; HILL, S.; HENNECKE, M.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 185, p. 75-81, 1982.

MERRICK, M.J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Symbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRRIS, R. H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, 1992. p. 835-876, 1992.

MERRICK, M.; CHAMBERS, S. The Helix-Turn-Helix Motif of σ^{54} Is Involved In Recognition of the -13 promoter region. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 7221-7226, 1992.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Reviews**, v. 59, p. 604-622, 1995.

MICHEL-REYDELLET, N.; KAMINSKI, A. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK Proteins Control Nitrogen Fixation and Ammonia Assimilation. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 2655-2658, 1999.

MILLER, J.H. **A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992.

MONEY, T.; JONES, T.; DIXON, R.; AUSTIN, S. Isolation and Properties of the Complex between the Enhancer Binding Protein NIFA and the Sensor NIFL. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 4461-4468, 1999.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.**, v. 447, p. 283-286, 1999a.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. In-trans regulation of the N-truncated-NIFA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 157-161, 1999b.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Use of lactose to induce expression of soluble NifA protein domains of *Herbaspirillum seropedicae* in *Escherichia coli*. **Can. J. Microbiol.**, v. 46, p. 1087-1090, 2000.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; WASSEM, R.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.**, v. 508, p. 1-4, 2001.

MONTEIRO, Rose Adele. **Análise funcional dos domínios modulares da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2001. Tese (doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Fnr Is Involved in Oxygen Control of *Herbaspirillum seropedicae* N-Truncated NifA Protein Activity in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 1527-1531, 2003a.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; STEFFENS, M.B.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Expression, purification and functional analysis of the C-terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Expr. Purif.** v. 27, p. 313-318, 2003b.

MONTESINOS, M.L.; MURO-PASTOR, A.M.; HERRERO, A.; FLORES, E. Ammonium/Methylammonium Permeases of a Cyanobacterium. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 31463-31470, 1998.

MORETT, E; CANNON, W.; BUCK, M. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequence of the *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 11469-1488, 1988.

MORETT, E.; BUCK, M. NifA-dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 9401-9405, 1988.

MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ^{54} Bacterial Enhancer Binding-Protein Family: Mechanism of Action and Phylogenetic Relationship of Their Functional Domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6067-6074, 1993.

NINFA, A.J.; MAGASANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NR_I, by the *glnL* product, NR_{II}, regulates the transcription of the *glnALG* operon of the *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 83, p. 5909-5913, 1986.

NINFA, A.J.; ATKINSON, M.R. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 172-179, 2000.

NINNEMANN, O.; JAUNIAUX, J.; FROMMER, W.B. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter for plants. **EMBO J.**, v. 13. p. 3464-3471, 1994.

NOINDORF, L.; REGO, F.G.M; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185 (1), p. 55-62, 2005.

NOINDORF, L. **Identificação e caracterização do operon *orf1glnKamtB* e do gene *amth* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2006. Tese (doutorado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

OLIVARES, F. L.; JAMS, E.K.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugarcane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **New Phytol.**, v. 135, p. 723-737, 1997.

OGURA, T.; WILKINSON, A.J. AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. **Genes cells**, v. 6, p. 575-597, 2001.

OGURA, T.; WHITEHEART, S.W.; WILKINSON, A.J. Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. **J. Struct. Biol.**, v. 146, p. 106-112, 2004.

PAGET, M.S.B.; HELMANN, J.D. The σ^{70} family of sigma factors. **Genome Biol.**, v. 4, p.203, 2003.

PASCHEN, A.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. *Rhodobacter capsulatus nifA* mutants mediating *nif* genes expression in the presence of ammonium. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 200, p. 207-213, 2001.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.U.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; GROSS, S.; BIERHOFF, H.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B. Yeast Two-Hybrid Studies on Interaction of Proteins Involved in Regulation of Nitrogen Fixation in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.** v. 185, p. 5240-5247, 2003.

RAMOS, M.G.; VILLATORO, M.A.A.; URQUIAGA, S. ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using ¹⁵N-isotope techniques. **J. Biotechnol.**, v. 91, p. 105-115, 2001.

RAPPAS, M. SCHUMACHER, J.; BEURON, F.; NIWA, H.; BORDES, P.; WIGNESHWARARAJ, S.; KEETCH, C.A.; ROBINSON, C.V.; BUCK, M.; ZHANG, X. Structural Insights into the Activity of Enhancer-Binding Proteins. **Science**, v. 307, p. 1972-1975, 2005.

RAPPAS, M.; SCHUMACHER, J.; NIWA, H.; BUCK, M.; ZHANG, X. Structural Basis of the Nucleotide Driven Conformational Changes in the AAA+ Domain of Transcriptional Activator PspF. **J. Mol. Biol.**, v. 357, p. 481-492, 2006a.

RAPPAS, M.; BOSE, D.; ZHANG, X. Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking σ^{54} -dependent gene transcription. **Curr. Opin. Struct. Opin.**, v. 17, p. 1-7, 2006b.

REITZER, L.; SCHNEIDER, B.L. Metabolic Context and Possible Physiological Themes of σ^{54} -Dependent Genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 422-444, 2001.

REITZER, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 155-176, 2003.

RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 45, p. 39-47, 2003.

RUDNICK, P.; KUNZ, C.; GUANATILAKA, M.K.; HINES, E.R.; KENNEDY, C. Role of GlnK in NifL-Mediated Regulation of NifA Activity in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 812-820, 2002.

RYLE, M.J.; LANZILOTTA, W.N.; SEEFELDT, L.C.; SCARROW, R.C.; JENSEN, G.M. Circular Dichroism and X-ray Spectroscopies of *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase Iron Protein. **J. Biol. Chem**, v. 271, p. 1551-1557, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SASSE-DWIGHT, S.; GRALLA, J.D. Probing the *Escherichia coli* *glnALG* upstream activation mechanism *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 8934-8938, 1988.

SCHLESSMAN, J.M.; WOO, D.; JOSHUA-TOR, L.; HOWARD, J.B.; REES, D.C. Conformational Variability in Structures of the Nitrogenase Iron Proteins from *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. **J. Mol. Biol**, v. 280, p. 669-685, 1998.

SCHMITZ, R.A. NifL of *Klebsiella pneumoniae* carries a N-terminally bound FAD cofactor, which is not directly required for the inhibitory function of NifL. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 157, p. 313-318, 1997.

SCHUMACHER, J.; ZHANG, X.; JONES, S.; BORDES, P.; BUCK, M. ATP-dependent Transcriptional Activation by Bacterial PspF AAA+ Protein. **J. Mol. Biol.**, v. 338, p. 861-875, 2004.

SCHUMACHER, J.; JOLY, N.; RAPPAS, M.; ZHANG, X.; BUCK, M. Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcription activation. **J. Struct. Biol.**, v. 156, p. 190-199, 2006.

SCHWAB, Stefan. **Identificação e caracterização de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio**. Curitiba, 2006. Tese (doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SCHOLLHORN, R.; BURRIS, R.H. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V. 58, p. 213-216, 1967.

SCOTT, D.J.; FERGUSON, A.L.; GALLEGOS, M.; PITT, M.; BUCK, M.; HOGGETT, J.G. Interaction of sigma factor σ^N with *Escherichia coli* RNA polymerase core enzyme. **Biochem. J.**, v. 352, p. 539-547, 2000.

SIEWE, R.M.; WEIL, B.; BURKOVSKI, A.; EIKMANN, B.J.; EIKMANN, M.; KRAMER, R. Functional and Genetic Characterization of the (Methyl)ammonium Uptake Carrier of *Corynebacterium glutamicum*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 5398-5403, 1996.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, p. 1095-1096, 1984.

SHAH, V.K.; BRILL, W.J.; Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 3249-3253, 1977.

SOUPENE, E.; HE, L.; YAN, D.; KUSTU, S. Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 7030-7034, 1998.

SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 1511-1522, 1991a.

SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 425-429, 1991b.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; MACHADO, H. B.; DRUMMOND, M.; YATES, M.G. The N-terminus of the NifA protein of *H. seropedicae* is probably involved in sensing of ammonia. In: **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. TIKHONOVICH, I.A.; NIKOLAI, A.P.; VASSILY, I.R.; WILLIAM, E.N. (eds.) X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, p. 260, 1995.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA Activity by Ammonium Ions and Oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681-684, 1999.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Expression of the *nifA* gene of the *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and the NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiol.** v. 146, p. 1407-1418, 2000.

STIPS, J.; THUMMER, R.; NEUMANN, M.; SCHMITZ, R.A. GlnK effects complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 3379-3388, 2004.

STUDHOLME, D.J.; DIXON, R. Domain Architectures of σ^{54} -Dependent Transcriptional Activators. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 1757-1767, 2003.

SU, W.; PORTER, S.; KUSTU, S.; ECHOLS, H. DNA-looping and enhancer activity: Association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 5504-5508, 1990.

TABOR, S.; RICHARDSON, C.C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 1074-1078, 1985.

TAYLOR, B.L.; ZHULIN, I.B. PAS domains: internal sensor of oxygen, redox potential, and light. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 479-506, 1999.

TUCKER, N.P.; D'AUTRÉAUX, B.; STUDHOLME, D.J.; SPIRO, S.; DIXON, R. DNA Binding Activity of the *Escherichia coli* Nitric Oxide Sensor NorR Suggests a Conserved Target Sequence in Diverse Proteobacteria. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 6656-6660, 2004.

TUCKER, N.P.; D'AUTRÉAUX, B.; SPIRO, S.; DIXON, R. DNA binding properties of the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR: towards and understanding of the regulation of flavorubredoxin expression. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 181-183, 2005.

TULI, R.; MERRICK, M.J. Over-production and characterisation of the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae*-the transcription activator of *nif* gene expression. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 425-432, 1988.

THOMAS, G.H.; MULLINS, J.G.L; MERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 331-334, 2000a.

THOMAS, G.H.; COUTTS G.; MERRICK, M. The *glnKamtB* operon. **Trends. Genet.**, v. 16, p. 11-14, 2000b.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Mol. Genet. Genomics**, v. 266, p. 813-820, 2002.

WANG, L.; GRALLA, J.D. Multiple In Vivo Roles of the -12-Region Elements of Sigma 54 Promoters. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 5626-5631, 1998.

WANG, H.; FRANKE, C.C.; NORDLUND, S.; NORÉN, A. Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*; dependence on GlnJ and AmtB1. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, p. 273-279, 2005.

WASSEM, R.; SOUZA, E.M.; YATTES, M.G.; PEDROSA, F.O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 756-764, 2000.

WASSEM, R.; PEDROSA, F.O.; YATTES, M.G.; REGO, F.G.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 212, p. 177-182, 2002.

WEIBEZAHN, J.; SCHLIEKER, C.; BUKAU, B.; MOGK, A. Characterization of a Trap Mutant of the AAA+ Chaperone ClpB. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 32608-32617, 2003.

WOOTTON, J.C.; DRUMMOND, M. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory protein. **Protein Eng.**, v. 2, p. 535-543, 1989.

WOSTEN, M.M.S.M. Eubacterial sigma factors. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 22, p. 127-150, 1998.

ZHANG, X.; CHANEY, M.; WIGNESHWERARAJ, S.R.; SHUMACHER, J.; BORDES, P.; CANNON, W.; BUCK, M. Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. **Mol. Microbiol.**, v. 45, p. 895-903, 2002.

ZHANG, Y.; POLHMANN, E.L.; ROBERTS, G.P. Identification of a critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, p. 2782-2787, 2004.

ZHENG, L.; KOSTREWA, D.; BERNECHE, S.; WINKLER, F.K.; LI, X. The mechanism of ammonia transport based in crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, p. 17090-17095, 2004.

ZHULIN, I.B.; TAYLOR, B.L.; DIXON, R. PAS domain S-boxes in Archea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 22, p. 331-333, 1997.